

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARO DE DNA E DE DETOXIFICAÇÃO COMO POSSÍVEIS MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA

ALINE FERNANDA RODRIGUES SEREIA

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ilíada Rainha de Souza

Florianópolis, 2009

ALINE FERNANDA RODRIGUES SEREIA

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARO DE DNA E DE
DETOXIFICAÇÃO COMO POSSÍVEIS MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE
AO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia pelo Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilíada Rainha de Souza

**FLORIANÓPOLIS
2009**

Sereia, Aline Fernanda Rodrigues

Identificação de polimorfismos em genes de reparo de DNA e de detoxificação como possíveis marcadores de susceptibilidade ao câncer de mama / Aline Fernanda Rodrigues Sereia – Florianópolis, UFSC/2009

129 f. il.

Orientadora Prof^{ra}. Dr^a. Iliada Rainha de Souza

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, 2009.

1. Genética Humana, 2. Câncer de Mama, 3. Marcadores Moleculares

DEDICATÓRIA

Aos meus amores, Mãe, Pai e Rô.

É por vocês que realizo tudo em minha vida.

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família." (Leon Tolstoi)

AGRADECIMENTOS

Aqui, tento expressar a imensa gratidão por tudo que realizei no período de construção desse trabalho.

A Deus, meu maior e inseparável companheiro, que sempre me leva pela trilha da aprendizagem, seja qual for o destino.

As pacientes, que mesmo enfrentado uma doença temida, não se deixaram abater e permaneceram fortes, possibilitando a realização desse trabalho e contribuindo com grandes lições de vida, que me marcaram fortemente. Vocês são as maiores guerreiras que conheci!

As mulheres que abraçaram a causa desse trabalho, tentando sempre dar o melhor de si para que pudesse ser coletada a maior quantidade de dados possível, não se importando com “picadinhas” de agulha e conversas longas.

Aos funcionários, enfermeiros e médicos dos hospitais colaboradores que acolheram com carinho o propósito desse trabalho e a mim também.

A minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Ilíada Rainha de Souza, por ter me acolhido com tanta confiança e carinho e com quem me senti confortada como no colo de uma mãe. Obrigada pelas histórias compartilhadas, pelas risadas saborosas, pelas lágrimas derramadas juntas e principalmente por toda a aprendizagem, científica e pessoal, que possibilitaram a minha realização profissional. Se hoje eu me sinto tão feliz fazendo o que faço, devo muito a você, minha professora.

Ao meu anjo Lia Kubelka, uma verdadeira mestra para mim que me iniciou no “mundo das micropipetas” e me ensinou a amar o laboratório! Você é muito mais que uma amiga, é uma companheira, um anjo que aterrisou na minha vida me trazendo muitas bênçãos e alegrias. Obrigada pelas longas e deliciosas conversas, pelo imenso apoio e por acreditar em mim!

Aos colegas do LAPOGE, Ticiane (companheira pra tudo!), Tiago (minha dupla dinâmica no mestrado), Cíntia, Dianne, Pati (minha pupila), Renata, Maria Luisa, Eduardo, Luisa, Fidel e Daiane por toda companhia no laboratório, nos “happy hours” e jantinhas!

A Dr^a. Karin Braun Prado que doou seu tempo me ajudando de forma valiosa com as análises estatísticas.

Ao querido Dr. Marcelo Luizon que atendeu meu pedido de última hora e me ajudou no desfecho do trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi, minha tutora que com imenso empenho e carinho me auxiliou na redação desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a Luciane Regina Cavalli que aceitou o convite para compor a banca de avaliação desse trabalho, mesmo a distância.

Ao Prof^a. Dr. Eduardo Martín Tarazona Santos, que prontamente aceitou em participar da composição da banca avaliadora desse trabalho.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, com quem aprendi muito nesses dois anos de realização do curso de mestrado.

Aos órgãos financiadores, CAPES, FAPESC e CNPq, que possibilitaram a realização desse trabalho.

Com imenso amor:

Ao ballet, minha paixão que sempre me faz sentir que não há problema algum.

A minha mãe Maria Neide, minha maior lição de vida, educadora e amiga. Obrigada pelo sacrifício, pelo colo, pelo apoio em todas as horas e por esse amor tão forte que muitas vezes é o que me sustenta em pé. Eu tenho imenso orgulho de ter uma mãe admirável como você!

Ao meu pai João, meu exemplo de honestidade e dedicação. Se hoje eu estou aqui foi porque você sempre me apoiou, mesmo enfrentando muitas dificuldades para isso. Eu nunca esquecerei toda a garra que você teve para possibilitar a realização dos meus sonhos, obrigada de coração!

Ao meu irmão Rodrigo, a quem sempre admirei pela serenidade e alegria de viver. Com você eu tive a melhor conversa, onde eu percebi o quanto nós somos irmãos de verdade. Sei que o terei sempre para me apoiar. Você é um exemplo de homem para mim, te amo.

A toda minha família e amigos, que mesmo de longe, sempre torcem e mandam energias positivas.

As lágrimas, instrumentos muitas vezes dolorosos, porém eficazes de aprendizagem.

O que me tranqüiliza é que tudo o que existe, existe com uma precisão absoluta. O que for do tamanho de uma cabeça de alfinete não transborda nem uma fração de milímetro além do tamanho de uma cabeça de alfinete. Tudo o que existe é de uma grande exatidão. Pena é que a maior parte do que existe com essa exatidão nos é tecnicamente invisível. O bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. Nós terminamos adivinhando, confusos, a perfeição.

Clarice Lispector

RESUMO

Câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de doenças que pode afetar várias partes do corpo e caracteriza-se pela proliferação celular anormal que tende a ser agressiva determinando a formação de tumores. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama, apresentando altas taxas de mortalidade. Alguns processos biológicos, como o controle do ciclo celular, a apoptose, os processos de reparo de DNA lesado, vias metabólicas hormonais e de xenobióticos, estão intimamente ligados ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Genes que codificam proteínas e enzimas importantes para essas rotas podem conter mutações ou polimorfismos que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama. Esse trabalho procurou identificar possíveis marcadores genéticos de susceptibilidade ao câncer de mama através da análise de polimorfismos em genes de reparo de DNA e detoxificação em 162 mulheres diagnosticadas com câncer de mama e em 148 mulheres não afetadas pela doença e sem histórico familiar da mesma, provenientes do Estado de Santa Catarina, Brasil, em um estudo caso-controle. Os polimorfismos tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) *Arg194Trp* e *Arg399Gln* do gene *XRCC1*, *Val-9Ala* do gene *MnSOD* e *Val158Met* do gene *COMT* foram identificados pela técnica de PCR-RFLP com eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida. As freqüências alélicas e genótípicas foram calculadas e submetidas ao teste χ^2 para verificar se estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A associação de determinados alelos, genótipos e dados clínicos e epidemiológicos (idade da menarca, idade da menopausa, nuliparidade, idade da primeira gestação, amamentação, utilização de anticoncepcional, índice de massa corpórea e tabagismo) com a susceptibilidade ao câncer de mama foi verificada através do teste *odds ratio* (OR), com Intervalo de Confiança (IC) de 95% e $p=0,05$ como o limite de significância. Através de regressão logística multivariada foram propostas combinações de dados genéticos, epidemiológicos e clínicos além de modelos de interação entre essas variáveis e o câncer de mama. Com exceção da freqüência genotípica de *MnSOD Val-9Ala* para casos, todas as freqüências genótípicas se encontram em EHW. As freqüências dos alelos polimórficos encontradas em casos e controles respectivamente foram: 0,378 e 0,328 (A) para *Arg194Trp*; 0,079 e 0,089 (T) para *Arg399Gln*; 0,521 e 0,463 (A) para *Val158Met*; 0,474 e 0,451 (C) para *Val-9Ala*. Não foi constatada qualquer associação estatisticamente significativa entre os SNPs analisados de forma individual e o câncer de mama. Foram encontradas associações positivas (risco) estatisticamente significativa para a combinação dos SNPs *XRCC1 Arg399Gln* e *COMT Val158Met* (OR=3,909; IC95% 1,078-14,176; Wald=4,302; $p=0,038$) e também de *MnSOD Val-9Ala* e *COMT Val158Met* (OR=2,129; IC95% 1,049-4,323; Wald=4,375; $p=0,036$) com o câncer de mama. Foi observada ausência de associação dos fatores epidemiológicos e clínicos analisados isoladamente bem como da combinação destes com os SNPs e o câncer de mama. Apesar de ter-se identificado um modelo de interação que melhor representou a interação entre as características genéticas, clínicas e epidemiológicas e o câncer de mama, não há como afirmar com absoluta segurança que este modelo possa ser associado ao aumento do risco de câncer de mama.

Palavras-chave:

Câncer de mama, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *XRCC1*, *COMT*, *MnSOD*.

ABSTRACT

Cancer is a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body and is characterized by abnormal cell proliferation that tend to be very aggressive determining the formation of tumors. Breast cancer is the second most common cancer in the world and the most commonly among women. Each year, 22% of new cases of cancer in women are breast cancer, presenting high mortality rates. Some biological processes, such as cell cycle control, apoptosis, DNA repair, hormonal and xenobiotics metabolic pathways, are closely related to the development of various types of cancer, including breast cancer. Genes that encode proteins and enzymes important for these pathways may carry mutations or polymorphisms that can contribute to the development of breast cancer. The aim of this study was to identify possible genetic markers of susceptibility to breast cancer through the analysis of polymorphisms in detoxification and DNA repair genes in 162 women diagnosed with breast cancer and 148 women not affected by the disease and with no family history, from the state of Santa Catarina, Brazil on a case-control study. The polymorphisms type SNP (single nucleotide polymorphism) *Arg399Gln* and *Arg194Trp* of *XRCC1* gene, *Val-9Ala* of *MnSOD* gene and *Val158Met* of *COMT* gene were identified by PCR-RFLP and visualized on agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. Genotype and allele frequencies were calculated and submitted to the χ^2 test to verify the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The association of certain alleles, genotypes and clinical and epidemiological data (age at menarche, age at menopause, nulliparity, age of first pregnancy, breastfeeding, use of contraceptives, body mass index and smoking) with the susceptibility to breast cancer was detected through *odds ratio* test (OR) with confidence intervals (CI) of 95% and $p = 0.05$. By multivariate logistic regression were proposed combinations of genetic data, and epidemiological and clinical models of interaction between these variables and breast cancer. Except for the genotypic frequency of *MnSOD Val-9Ala* for cases, all genotypic frequencies are in HWE. The frequency of polymorphic alleles found in cases and controls were respectively: 0.079 and 0.089 (T) for *Arg194Trp*; 0.378 and 0.328 (A) for *Arg399Gln*; 0.521 and 0.463 (A) for *Val158Met*; 0.474 and 0.451 (C) for *Val-9Ala*. There was no statistically significant association between SNPs analyzed in individual and breast cancer. We found positive associations (risk) statistically significant for the combination of SNPs *XRCC1 Arg399Gln* and *Val158Met COMT* (OR = 3.909, CI95% 1.078-14.176; Wald = 4.302, $p = 0.038$) and also *MnSOD Val-9Ala* and *COMT Val158Met* (OR = 2.129, CI 95% 1.049-4.323; Wald = 4.375, $p = 0.036$) with breast cancer. We observed no association of epidemiological and clinical factors analyzed separately and the combination of these with the SNPs and breast cancer. It was observed that there is no reliable model of interaction between the variables that can be associated with increased risk of breast cancer. Although it has been identified an interaction model that best represents the interaction among the SNPs and the other variables tested, can not be state with certainty that this model can be associated with the increase risk of breast cancer development.

Keywords:

Breast cancer, single nucleotide polymorphisms (SNPs), *XRCC1*, *COMT*, *MnSOD*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporção estimada de casos de câncer que podem ser prevenidos alterando nove fatores de risco.....	2
Figura 2. Estrutura da mama e diferenciação entre câncer invasivo e não invasivo.....	5
Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres de neoplasia maligna de mama feminina estimadas para o ano de 2009, segundo a Unidade da Federação.....	7
Figura 4. Estradiol e outros hormônios esteróides (em menor escala) dirigem a proliferação celular, o que facilita a fixação de erros genéticos. Mutações na linhagem germinativa em genes supressores de tumor relevantes aceleram a transformação para o fenótipo maligno.....	13
Figura 5. Mamografia de uma paciente antes e depois de três anos de uso de TRH, mostrando o aumento na densidade mamária causado pelo tratamento.....	15
Figura 6. Metabolismo do estrogênio nos ovários e no tecido epitelial da mama a partir de colesterol.....	18
Figura 7. Mecanismo de reparo por excisão de bases (BER), onde atua XRCC1.....	29
Figura 8. Representação do gene <i>XRCC1</i> e sua localização cromossômica.....	30
Figura 14. Representação do gene <i>MnSOD</i> e sua localização cromossômica.....	32
Figura 15. Metabolização de hormônios esteróides. Ação de várias enzimas (CYPs e HSDs).....	35
Figura 16. Continuação - Metabolização de hormônios esteróides. Formação de E ₂ e ação de detoxificação das enzimas COMT, SOD e GST.....	36
Figura 17. Em detalhe, a conversão de E ₂ em catecolestrogênios.....	37
Figura 18. Representação do gene <i>COMT</i> e sua localização cromossômica.....	38
Figura 19. Foto do gel de agarose 1% para verificação de integridade do DNA extraído.....	46
Figura 20. Análise do polimorfismo <i>XRCC1 194</i> através de digestão pela endonuclease de restrição <i>MspI</i> e visualização em gel de poliacrilamida 10%.....	50
Figura 21. Análise do polimorfismo <i>XRCC1 Arg399Gln</i> através de digestão pela endonuclease de restrição <i>MspI</i> e visualização em gel de agarose 2%.....	51
Figura 22. Análise do polimorfismo <i>COMT Val158Met</i> através de digestão pela endonuclease de restrição <i>NlaIII</i> e visualização em gel de agarose 5%.....	51

Figura 23. Análise do polimorfismo <i>MnSOD Val158Met</i> através de digestão pela endonuclease de restrição <i>NgoMIV</i> e visualização em gel de agarose 5%.....	51
Figura 24. Tabela de contingência 2x2 ilustrativa para o cálculo de <i>odds ratio</i>	52
Figura 25. Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação a origem geográfica.....	58
Figura 26. Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação a escolaridade.....	58
Figura 26. Frequências do alelo variante de <i>XRCC1 Arg399Gln</i> em várias populações reportadas por SAADAT e ANSARI-LARI (2008).	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas para o ano 2009 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de números de casos novos por câncer, em mulheres do estado de Santa Catarina e da capital Florianópolis.....	8
Tabela 2. Probabilidade idade-específica de desenvolver câncer de mama.....	9
Tabela 3. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR-RFLP.....	47
Tabela 4. Protocolos para as reações de PCR.....	47
Tabela 5. Programas utilizados para as reações de PCR.....	48
Tabela 6. Características das enzimas de restrição utilizadas nas reações de RFLP, protocolos para utilização das mesmas, protocolos para eletroforese em gel de agarose e tamanho dos fragmentos originados após a RFLP.....	49
Tabela 7. Protocolos para as reações de clivagem por enzima de restrição.....	50
Tabela 8. Categorização e classificação binária das características clínicas e epidemiológicas estudadas.....	56
Tabela 9. Frequências alélicas, genotípicas, <i>odds ratio</i> (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP <i>XRCCI Arg194Trp</i>	59
Tabela 10. Frequências alélicas, genotípicas, <i>odds ratio</i> (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP <i>XRCCI Arg399Gln</i>	60
Tabela 11. Frequências alélicas, genotípicas, <i>odds ratio</i> (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP <i>COMT Val158Met</i>	61
Tabela 12. Frequências alélicas, genotípicas, <i>odds ratio</i> (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP <i>MnSOD Val-9Ala</i>	62
Tabela 13. Categorização, frequência e <i>odds ratio</i> (OR) das características (dados clínicos e epidemiológicos coletados através de questionário) selecionadas para análise.....	63
Tabela 14. Análise dos SNPs <i>XRCCI Arg194Trp</i> , <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> de forma individual e combinada por regressão logística.....	64
Tabela 15. Categorização e classificação binária dos genótipos dos SNPs <i>XRCCI Arg194Trp</i> , <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> conforme <i>odds ratio</i> (OR) calculados preliminarmente.....	66
Tabela 16. Análise dos SNPs <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> combinados com as características clínicas e epidemiológicas selecionadas por regressão logística.....	68

Tabela 17. Análise dos SNPs <i>XRCCI Arg194Trp</i> , <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.....	69
Tabela 18. Análise dos SNPs <i>XRCCI Arg194Trp</i> , <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> e das características clínicas e epimiológicas por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.....	71
Tabela 19. Análise dos SNPs <i>XRCCI Arg194Trp</i> , <i>XRCCI Arg399Gln</i> , <i>COMT Val158Met</i> e <i>MnSOD Val-9Ala</i> e das características clínicas e epimiológicas que apresentaram os maiores valores de <i>odds ratio</i> (OR) por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.....	72
Tabela 20. Estudos de associação caso-controle realizados com o SNP <i>XRCCI Arg194Trp</i> e câncer de mama.....	79
Tabela 21. Estudos de associação caso-controle realizados com o SNP <i>XRCCI Arg399Gln</i> e câncer de mama.....	86
Tabela 22. Estudos de associação caso-controle realizados com o SNP <i>COMT Val158Met</i> e câncer de mama.....	93
Tabela 23. Estudos de associação caso-controle realizados com o SNP <i>MnSOD Val-9Ala</i> e câncer de mama.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
APE	<i>APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1</i>
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BER	<i>Base excision repair</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
C	Citosina
CE	Catecol oestrogênio
COMT	<i>Catechol-O-methyltransferase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	<i>Double-Strand Break</i>
E2	Oestradiol
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
G	Guanina
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
kDa	<i>KiloDalton</i>
NAT1	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)</i>
NAT2	<i>N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>p</i>	Probabilidade
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction -</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAD51	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOD1	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>
SOD2/MnSOD	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>
SOD3	<i>Superoxide dismutase 3, extracellular</i>
SSB	<i>Single-Strand Break</i>
STK11	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
T	Timina
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TRH	Terapia de reposição hormonal
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group D</i>
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
χ^2	Qui quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. O CÂNCER DE MAMA	5
2.1.1. Estatísticas do câncer de mama	6
2.1.2. Fatores de risco.....	8
2.1.3. Detecção precoce de câncer de mama	21
2.2. GENES E O CÂNCER DE MAMA	23
2.2.1. Genes de “alta penetrância”	23
2.2.2. Genes de “baixa penetrância”	24
2.3. A INSTABILIDADE QUÍMICA DO DNA.....	25
2.4. REPARO DE DNA LESADO	26
2.4.1. Reparo por excisão de bases (BER) e o gene <i>XRCC1</i>	27
2.5. PROCESSOS DE DETOXIFICAÇÃO	30
2.5.1. Espécies reativas de oxigênio e o gene <i>MnSOD</i>	30
2.5.2. Catecol oestrogênio e o gene <i>COMT</i>	33
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVOS	41
4.1. OBJETIVO GERAL.....	41
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5.1. ESTUDO POPULACIONAL	43
5.2. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	44
5.3. EXTRAÇÃO DE DNA	44
5.4. PCR-RFLP	46
5.5. DIGESTÃO POR ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO.....	48
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6. RESULTADOS.....	57

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL	57
6.2. ANÁLISES DOS SNPs DOS GENES <i>XRCC1</i> , <i>COMT</i> E <i>MnSOD</i>	59
6.2.1. SNP <i>XRCC1 Arg194Trp</i>	59
6.2.2. SNP <i>XRCC1 Arg399Gln</i>	60
6.2.3. SNP <i>COMT Val158Met</i>	61
6.2.4. SNP <i>MnSOD Val-9Ala</i>	62
6.3. ANÁLISE DOS SNPs POR REGRESSÃO LOGÍSTICA	63
6.4. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	65
6.5. ANÁLISES DAS COMBINAÇÕES ENTRE SNPs E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS POR REGRESSÃO LOGÍSTICA	67
6.6. ANÁLISE DE MODELOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE INTERESSE POR REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA	69
 7. DISCUSSÃO.....	 74
7.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.....	75
7.2. GENE <i>XRCC1</i>	76
7.2.1. SNP <i>XRCC1 Arg194Trp</i>	76
7.2.2. SNP <i>XRCC1 Arg399Gln</i>	82
7.3. GENE <i>COMT</i>	90
7.4. GENE <i>MnSOD</i>	97
7.5. MODELOS DE INTERAÇÃO DE FATORES DE RISCO	103
 8. CONCLUSÕES.....	 105
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 107
 ANEXO A.....	 118
ANEXO B.....	124

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar várias partes do corpo e caracteriza-se pela proliferação celular anormal (INCA, 2008c). Estas células tendem a ser muito agressivas determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Os diferentes tipos de câncer são nomeados conforme a parte do corpo onde o tumor originou-se. Essa proliferação incontrolada de células anormais pode afetar tecidos contíguos e se espalhar para outros órgãos do corpo levando ao chamado processo metastático. A metástase é a maior causa de morte por câncer (WHO, 2008). O câncer pode ter início em tecidos epiteliais, sendo designado carcinoma, ou em tecidos conjuntivos, sendo designado sarcoma e, em ambos os casos, pode haver metástase (INCA, 2008c).

O câncer é considerado uma doença de etiologia complexa por apresentar causa multifatorial, ou seja, pode ser atribuído a uma série de fatores ambientais, imunológicos, infecciosos, comportamentais e genéticos, que comumente, agem em conjunto em seu desenvolvimento. Certos tipos de câncer são relacionados com agentes infecciosos, como o vírus da hepatite B (HBV), papilomavirus humano (HPV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), e outros, e poderiam ser prevenidos com mudanças de comportamento, vacinas e antibióticos (ACS, 2008a). A “*American Cancer Society*” (ACS, 2008a) estima que aproximadamente um terço das 565.650 mortes por câncer esperadas para o ano de 2008 nos Estados Unidos da América (EUA) estarão relacionadas com excesso de peso ou obesidade, inatividade física e nutrição, e poderiam ser evitadas. Além disso, a mesma instituição estima que dos mais de um milhão de casos de câncer de pele que serão diagnosticados em 2008 nos EUA, muitos poderiam ser prevenidos com o uso de proteção para os raios solares e a não utilização de bronzamento artificial (ACS, 2008a).

Na Figura 1 é mostrado como mudanças em alguns hábitos poderiam diminuir a incidência de câncer.

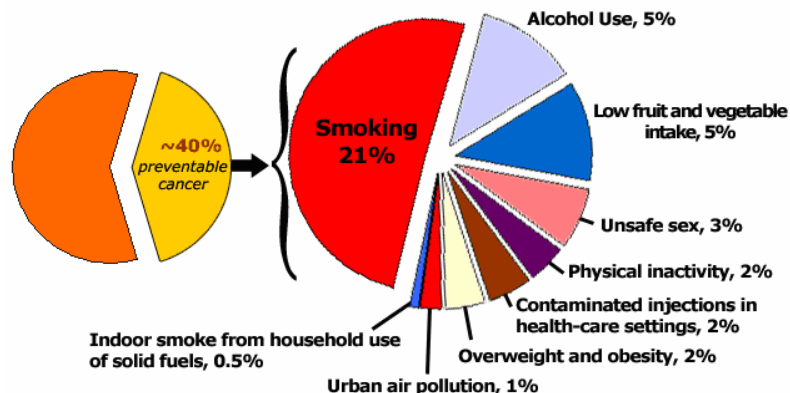


Figura 1. Proporção estimada de casos de câncer que podem ser prevenidos alterando nove fatores de risco. Fonte: WHO, 2008.

Alguns fatos sobre câncer no mundo (WHO, 2008; WHO; UICC, 2005):

- o número de casos de câncer em 2007 foi de 11,3 milhões e estima-se que esse número chegue a 15,5 milhões em 2030. Pelo menos 1/3 dos casos de câncer no mundo podem ser prevenidos;
- em 2007, o câncer foi responsável por 7,9 milhões de mortes, o que representou 13% do total de óbitos no mundo naquele ano. Os tipos de câncer responsáveis pela maioria dos óbitos são: pulmão (1,4 milhões mortes/ano), estômago (866 mil mortes/ano), fígado (653 mil mortes/ano), cólon (677 mil mortes/ano) e mama (548 mil mortes/ano). As mortes por câncer no mundo continuarão aumentando, estima-se que de 2007 a 2030 o aumento será de 45% , chegando a 11,5 milhões. Cerca de 40% das mortes por câncer podem ser evitadas com prevenção;
- cerca de 72% de todas as mortes por câncer no mundo ocorreram em países de baixa ou média renda. Os tipos de câncer mais frequentes nesses países são: rim, estômago e cervical. Nos países desenvolvidos, o câncer é a segunda maior causa de morte, após as

doenças cardiovasculares. Os tipos de câncer mais frequentes nesses países são: próstata, mama e cólon;

- existem vários fatores de risco bem determinados para o desenvolvimento de câncer como: tabagismo (responsável por 1,8 milhões de mortes/ano por câncer), obesidade e sedentarismo (juntos responsáveis por 274 mil mortes/ano por câncer), uso abusivo de álcool (responsável por 351 mil mortes/ano por câncer), infecção por papilomavírus humano (responsável por 235 mil mortes/ano por câncer) e carcinógenos ocupacionais (responsáveis por no mínimo 152 mil mortes/ano por câncer). Aproximadamente 43% das mortes por câncer estão relacionadas ao tabagismo, dieta alimentar e infecções.

No Brasil, em 2005, o câncer foi a causa de morte de aproximadamente 190.000 pessoas, das quais 113.000 tinham menos de 70 anos de idade. O câncer mais comum nas mulheres brasileiras em 2005 foi o de mama e para os homens brasileiros, o de próstata (WHO, 2008). Em 2008 são esperados 565.650 óbitos por câncer nos EUA, sendo 1.500 por dia. Neste país o câncer é a segunda causa de morte (uma em cada quatro mortes), perdendo apenas para doenças cardíacas (ACS, 2008a).

A “Estimativa 2008 – Incidência de Câncer no Brasil”, válida também para o ano de 2009, realizada pelo INCA (INCA, 2007), aponta que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer no Brasil em 2008/2009 (231.860 casos novos para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino), sendo os mais incidentes (com exceção do câncer de pele não melanoma) os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. O mesmo estudo estima que, o câncer de pele não melanoma será o mais incidente na população brasileira (115 mil casos novos), seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil). Para o sexo

masculino, os tumores mais incidentes serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), próstata (49 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (12 mil) e, para o sexo feminino destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (19 mil), cólon e reto (14 mil) e pulmão (9 mil). Ainda no mesmo estudo, as regiões Sul e Sudeste são apontadas por possuírem as maiores taxas de incidência de câncer, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostraram taxas mais baixas e, as taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário.

Os Institutos Nacionais de Saúde dos EUA estimam que os gastos com câncer em 2007 foram de aproximadamente US\$219.2 bilhões, sendo: US\$89.0 bilhões para gastos médicos diretos, US\$18.2 bilhões para gastos indiretos com a morbidade (perda de produtividade devido à doença) e US\$112.0 bilhões para gastos indiretos com a mortalidade (perda de produtividade devido à morte prematura) (ACS, 2008a). No Brasil, os gastos federais em assistência oncológica crescem acentuadamente; em 2000 o gasto era de aproximadamente R\$ 570.847.495,00 e em 2005 o gasto chegou a R\$ 1.159.724.708,00 – um aumento de 103% nos últimos seis anos (INCA, 2008a).

Como podemos observar, o câncer é uma das doenças que mais atinge a população mundial atualmente, tendo conseqüências desde psicológicas aos pacientes, até econômicas para os organismos de saúde pública mundiais, em especial nos países em desenvolvimento. Por ser uma doença de causa multifatorial há grande dificuldade na sua prevenção, diagnóstico e prognóstico, exigindo assim, grande atenção da comunidade científica. O maior conhecimento de sua etiologia e fatores de predisposição poderá no futuro permitir a elaboração de um plano de prevenção adequado às características individuais, utilizando ferramentas simples, como os marcadores genéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama inicia-se no tecido mamário que é composto por lóbulos (glândulas de leite) e ductos, que conectam os lóbulos ao mamilo; o restante da mama é formado por tecido adiposo, conectivo e linfático – Figura 2 (ACS, 2007).

Os carcinomas mamários mais frequentes são classificados como:

- Carcinoma *in situ* - carcinoma ductal *in situ* (DCIS) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS) se caracterizam por estarem confinados à área onde se originaram (ductos ou lóbulos), ou seja, não há invasão de tecidos vizinhos. Quase todos os cânceres nesse estágio podem ser curados (ACS, 2007).

- Carcinoma invasivo ou infiltrante - também se inicia nos lóbulos e ductos, porém ultrapassa a barreira do tecido onde se originou e invade o tecido mamário vizinho (ACS, 2007).

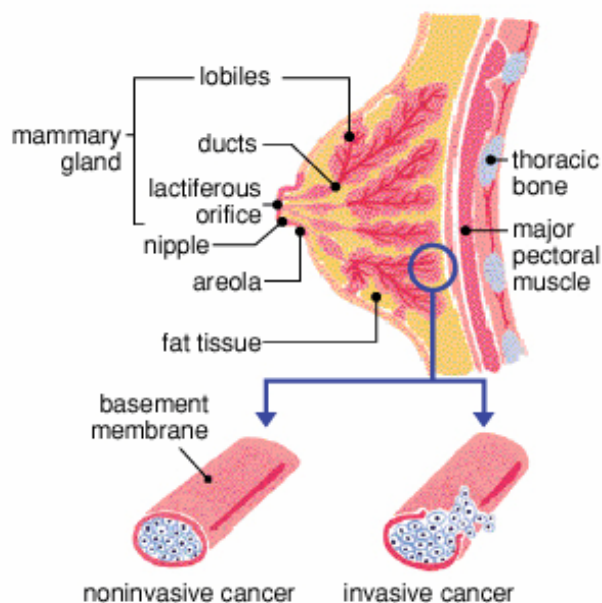


Figura 2. Estrutura da mama e diferenciação entre câncer invasivo e não invasivo. Fonte: disponível em: <http://lifescience.sysmex.co.jp/en/cancer/breastcancer/index.html>. Acesso em 26 julho 2007.

Para a maioria dos diferentes tipos de câncer, a classificação de tumores é baseada em três fatores principais (classificação TNM – Tumor, Nódulo e Metástase): tamanho do tumor (T), envolvimento de nódulos linfáticos (N) e presença ou ausência de metástase (M); uma vez T, N e M determinados, o tumor é então classificado em estádios - I, II, III ou IV - sendo I o mais inicial e IV o mais avançado (INCA, 2004b).

Os sinais mais precoces da existência de um câncer de mama são anormalidades detectadas em mamografia, antes mesmo de serem identificadas pela própria mulher ou um profissional de saúde e tumores maiores podem ser identificados pela mulher como uma massa indolor (ACS, 2008a; ACS, 2007). Alguns sintomas menos comuns são mudanças na mama como espessamento, descamação ou retração da pele, inchaço, vermelhidão e ulceração, retração ou derramamento espontâneo de fluído pelo mamilo. Porém, tipicamente a dor na mama resulta de uma condição benigna (ACS, 2008a; ACS, 2007).

2.1.1. Estatísticas do câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo (mais de 1.050.000 casos/ano) e o mais comum entre as mulheres, sendo um problema importante tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (INCA, 2007; IARC, 2003). A cada ano, 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama, sendo que as taxas de mortalidade são altas; na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2007).

O câncer de mama é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente, representando nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres (INCA, 2008b).

A “*American Cancer Society*” estimou para 2008, 182.460 novos casos de câncer de mama invasivo em mulheres norte-americanas e 1.990 novos casos de câncer de mama nos

homens; assim, excluindo câncer de pele, o câncer de mama é o tipo de câncer mais diagnosticado em mulheres norte-americanas (ACS, 2008a). Além disso, em 2008 são esperados 67.770 novos casos de câncer de mama *in situ* em mulheres dos EUA, dos quais 85% serão carcinomas ductais *in situ* (ACS, 2008a). Estima-se 40.930 mortes (40.480 mulheres e 450 homens) por câncer de mama nos EUA, sendo a segunda maior causa de mortes por câncer em mulheres (depois de câncer de pulmão) (ACS, 2008a).

O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2009 é de 49.400 (Figura 3), com risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres, sendo que na região Sul ele é o mais freqüente entre as mulheres (67/100.000), sem considerar o câncer de pele não melanoma (INCA, 2007). No Brasil, o câncer de mama é a maior causa de óbitos por câncer na população feminina, principalmente na faixa etária entre 40 e 69 anos (INCA, 2008d). Em Santa Catarina estima-se que haverá 1.610 casos novos de câncer de mama feminina em 2009 e na capital Florianópolis, 130 novos casos – Tabela 1 (INCA, 2007).

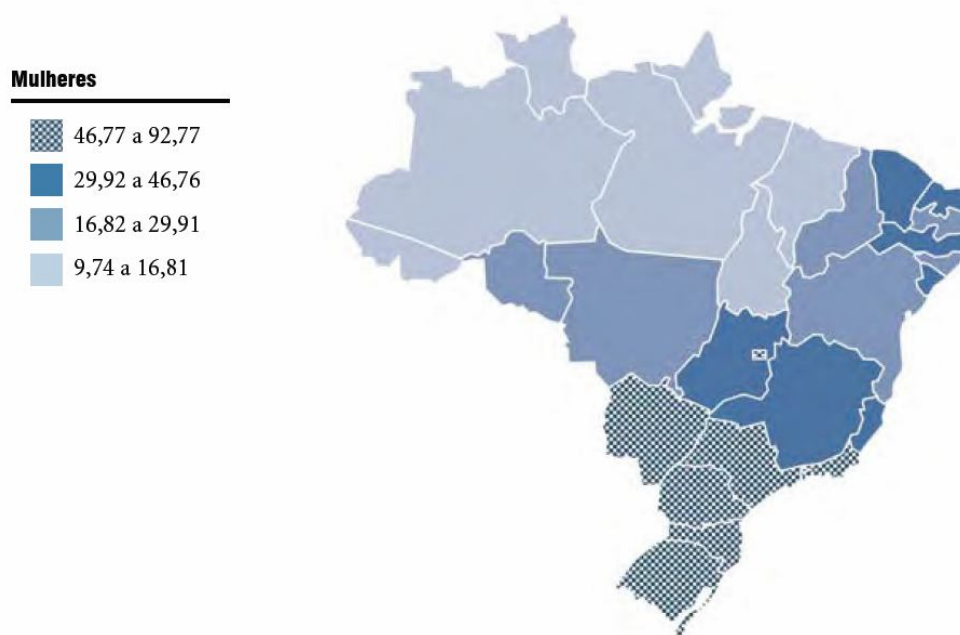


Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres de neoplasia maligna de mama feminina estimadas para o ano de 2009, segundo a Unidade da Federação. Fonte: INCA, 2007.

Tabela 1. Estimativas para o ano 2009 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de números de casos novos por câncer, em mulheres do estado de Santa Catarina e da capital Florianópolis. Fonte: INCA, 2007.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	1.610	52,03	130	62,45
Colo do Útero	510	16,38	40	19,18
Cólon e Reto	510	16,37	50	26,19
Traquéia, Brônquio e Pulmão	360	11,84	30	14,16
Estômago	280	9,12	20	9,65
Leucemias	170	5,53	**	4,70
Cavidade Oral	80	2,63	**	5,59
Pele Melanoma	250	8,08	20	7,94
Esôfago	110	3,32	**	0,96
Outras Localizações	1.890	61,37	**	0,00
Subtotal	5.770	187,36	320	158,08
Pele não melanoma	2.680	86,98	350	171,42
Todas as Neoplasias	8.450	274,37	670	330,98

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

** Menor que 15 casos.

Ao observar as estatísticas brasileiras e mundiais sobre a incidência de câncer, podemos constatar o alto risco do desenvolvimento de câncer de mama entre as mulheres, sendo este provavelmente o mais temido devido, sobretudo, aos seus efeitos psicológicos negativos, que afetam a sexualidade e a própria imagem pessoal (INCA, 2008b).

2.1.2. Fatores de risco

- **Sexo:** o câncer de mama é o mais comum em mulheres; homens possuem baixo risco de desenvolver câncer de mama (ACS, 2007).

- **Idade:** depois de sexo feminino, a idade é o fator de risco mais importante para câncer de mama (ACS, 2007; ACS, 2008a). A Tabela 2 mostra a probabilidade de mulheres desenvolverem câncer de mama em diferentes idades. O risco de desenvolver câncer de mama aumenta com a idade, a maioria dos casos ocorre após os 50 anos de idade, porém, em mulheres com susceptibilidade genética, o câncer de mama tende a ocorrer mais cedo que nos casos esporádicos (NCI, 2008). Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo ocorre na fase de pré-menopausa e é caracterizado

por ser mais agressivo e receptor de estrogênio (ER) negativo; o segundo ocorre na fase de pós-menopausa e está associado com características indolentes e principalmente por ser ER positivo (INCA 2007).

Tabela 2. Probabilidade idade-específica de desenvolver câncer de mama*. Adaptado de ACS, 2007.

Idade	Probabilidade de desenvolver câncer de mama nos próximos 10 anos**	Ou uma em
20	0,05%	1.837
30	0,43%	234
40	1,43%	70
50	2,51%	37
60	3,51%	26
70	3,88%	24

* Baseado nos casos diagnosticados nos EUA entre 2002-2004. Os valores das porcentagens e “uma em” não são numericamente equivalentes devido ao arredondamento.

** Probabilidade calculada utilizando DevCan Software, versão 6.2.1

- **Histórico familiar:** em alguns casos, mulheres afetadas por câncer de mama não apresentam um histórico hormonal e comportamental compatível com o aparecimento da doença; em grande parte desses casos há um componente familiar, que pode ter contribuído para o aparecimento da doença. Depois de gênero (feminino) e idade (após 50 anos), o histórico familiar positivo para câncer é o mais forte fator de risco observado para câncer de mama (NCI, 2008). Mulheres com histórico familiar positivo para câncer de mama, especialmente com parentes de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) afetadas, possuem risco aumentado de desenvolver câncer de mama; o risco aumenta quanto maior o número de parentes de primeiro grau afetados e quanto menor a idade do parente afetado (ACS, 2007).

Estima-se que de 5 a 10% dos casos de câncer de mama são devidos às mutações ou alterações nos genes de susceptibilidade ao câncer de mama *BRCA1* e *BRCA2* (ACS, 2007). Mutações nesses dois genes são responsáveis por cerca de 16% do risco familiar de câncer de mama (STRATTON; RAHMAN, 2008). Acredita-se que as mulheres acometidas por câncer de mama com histórico familiar positivo, apresentem mutações herdadas ou alterações nos

genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estima-se que mulheres com mutações no gene *BRCA1* tenham risco de 65% de desenvolver câncer de mama até os 70 anos de idade e o correspondente para o gene *BRCA2* é de 45%, porém, estas mutações estão presentes em cerca de 1% da população geral apenas (ACS, 2007).

Algumas características que sugerem se tratar de câncer de mama hereditário (NCI, 2008; McPHERSON *et al.*, 2000):

- idade precoce de ocorrência da doença (de 5 a 15 anos mais cedo comparado com casos esporádicos de câncer de mama);
- dois ou mais cânceres primários no indivíduo (por ex. câncer de mama bilateral ou câncer de mama e ovário no mesmo indivíduo);
- casos de câncer de mama masculino na família.
- um parente de primeiro grau diagnosticado antes dos 40 anos de idade;
- dois parentes de primeiro ou segundo graus diagnosticados antes dos 60 anos;
- três parentes de primeiro ou segundo graus diagnosticados com câncer de ovário ou mama;
- casos de câncer na família em outros órgãos relacionados, principalmente ovário e próstata, em qualquer idade.

Alguns grupos populacionais, como os Judeus Ashkenazi, possuem maior prevalência de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (ACS, 2008a), sendo que, o risco e a incidência de câncer de mama nesse grupo são maiores. Nesse grupo há duas mutações específicas (uma em *BRCA1* e a outra em *BRCA2*) presentes em alta frequência: um em cada 1.000 indivíduos nessa população carrega pelo menos uma dessas duas mutações, as quais são responsáveis por 40% dos casos de câncer de ovário e 20% dos casos de câncer de mama (IARC, 2003).

Porém, o risco familiar não é devido somente a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, acredita-se que a maioria das ocorrências de câncer de mama familiar resulta de interações entre fatores como o estilo de vida e variações em outros genes de alta susceptibilidade e também em genes de baixa susceptibilidade (ACS, 2007).

• **Histórico reprodutivo e hormonal:** a mama é um órgão hormônio-responsivo por excelência; o seu desenvolvimento é influenciado por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento, respondendo a eles de modo seletivo, estimulando crescimento e diferenciação celular (L'HERMITEA *et al.*, 2008). Os hormônios reprodutivos influenciam o risco de desenvolver câncer de mama por afetarem a proliferação celular e causarem danos ao DNA – Figura 4 (ACS, 2007). Estrogênios (estradiol, estriol e estrona) e progesterona são hormônios secretados pelos ovários responsáveis pelo desenvolvimento sexual feminino. O estrogênio possui papel na promoção da proliferação celular tanto em tecidos normais como em tecido mamário neoplásico; a progesterona também possui papel importante no tecido mamário por agir em conjunto com o estrogênio na regulação do desenvolvimento da mama (L'HERMITEA *et al.*, 2008). Algumas das principais características hormonais e reprodutivas que aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, por afetarem a produção de hormônios reprodutivos endógenos são (ACS, 2008a; NCI, 2008; ACS, 2007; IARC, 2003):

- idade prematura de menarca (<12 anos);
- idade tardia de menopausa (>55 anos);
- idade tardia da primeira gestação (>30 anos);
- curto período de lactação;
- pequeno número de gestações;
- nuliparidade.

Todas essas características conferem uma exposição prolongada a hormônios esteróides (ACS, 2007). Estrógenos aumentam a proliferação de células do tecido mamário e inibem a apoptose em experimentos “*in vitro*” e sua administração “*in vivo*” (camundongos) aumentaram o desenvolvimento de tumores (IARC, 2003). Um estudo realizado por BLANK *et al.* (2008), no qual ratos ovariectomizados (retirada cirúrgica dos ovários) e não ovariectomizados foram submetidos a tratamentos com a administração de diferentes doses de estrogênio ou estrogênio e progesterona, demonstrou que ratos não ovariectomizados tratados com altas dosagens (30mg) de estrogênio apresentaram um aumento drástico (75%) no desenvolvimento de câncer mamário, enquanto que aqueles ovariectomizados não desenvolveram câncer mamário; porém quando progesterona em alta dosagem (30mg) também foi adicionada ao tratamento (estrogênio + progesterona), todos os ratos apresentaram um aumento drástico (100%) de câncer de mama, indicando que a combinação dos dois hormônios possui papel importante na carcinogênese mamária.

O número elevado de gestações (mais que três), idade precoce da primeira gestação e a amamentação são conhecidos como “fatores de proteção” ao câncer de mama (NCI, 2008; ACS, 2007). O risco de câncer de mama em mulheres que tiveram o primeiro filho depois dos 30 anos é aproximadamente duas vezes maior que mulheres que tiveram seu primeiro filho antes dos 20 anos; o grupo de maior risco é aquele de mulheres que tiveram seu primeiro filho após os 35 anos de idade, podendo apresentar um risco mais elevado de câncer de mama que mulheres nulíparas; mulheres que tem um segundo filho também em idade precoce reduzem ainda mais o risco de desenvolver câncer de mama (McPHERSON *et al.*, 2000). Lactação prolongada reduz o número de ciclos ovulatórios, reduzindo a exposição a hormônios esteróides (HENDERSON; FEIGELSON, 2000).

Altas taxas de oestradiol, progesterona, ou ambos, em mulheres em pré-menopausa causam um aumento considerável no risco de câncer de mama, enquanto concentrações bem mais baixas de oestradiol e progesterona em mulheres pós-menopausa causam o mesmo efeito (KEY, 1999). Oestradiol e progesterona não são genotóxicos, porém suas altas concentrações aumentam o risco de câncer de mama em mulheres em pré-menopausa por aumentarem a taxa mitótica das células epiteliais da mama (KEY, 1999).

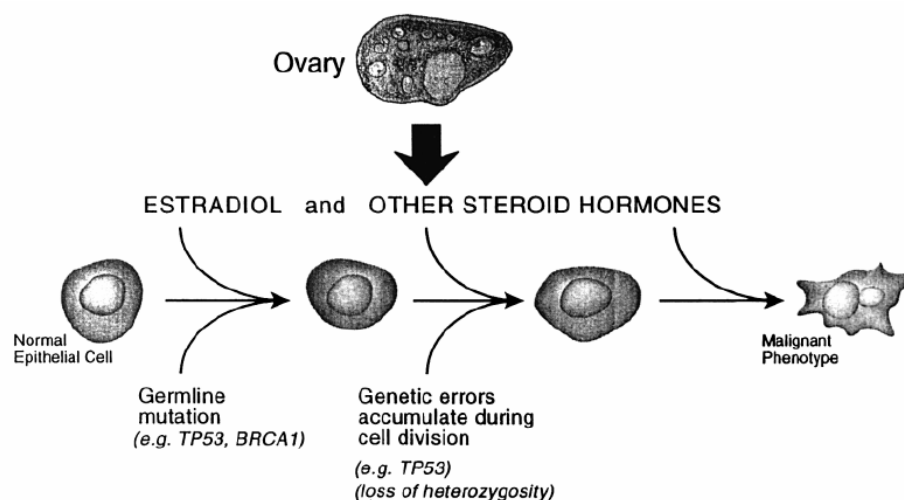


Figura 4. Estradiol e outros hormônios esteróides (em menor escala) dirigem a proliferação celular, o que facilita a fixação de erros genéticos. Mutações na linhagem germinativa em genes supressores de tumor relevantes aceleram a transformação para o fenótipo maligno. Fonte: HENDERSON; FEIGELSON, 2000.

- **Contraceptivos orais:** mais de 200 milhões de mulheres utilizaram contraceptivos orais desde que estes foram introduzidos nos anos 60 e em torno de 60 milhões de mulheres ainda os utilizam (IARC, 2003). O uso contínuo e recente de contraceptivos orais aumenta discretamente o risco de desenvolver câncer de mama; mulheres que interrompem a utilização de contraceptivos orais por 10 anos ou mais possuem o mesmo risco de mulheres que nunca utilizaram pílula (ACS, 2007; IARC, 2003). A limitação do uso de contraceptivos orais, em conjunto com outras ações como, limitar uso de álcool e de terapia de reposição hormonal, talvez possa reduzir significativamente o risco de câncer de mama

(FEIGELSON; HENDERSON, 2000). Há, no entanto, uma série de trabalhos com câncer de ovário e de endométrio que apontam o uso de contraceptivos orais como fator de proteção, portanto deve-se ter cuidado ao afirmar que a utilização de contraceptivos orais é um fator de risco ou proteção para o desenvolvimento dos diversos tipos de câncer (NCI, 2008; IARC, 2003).

• **Terapia de reposição hormonal:** ou TRH aumenta o risco de câncer de mama para mulheres que fazem o uso contínuo e prolongado. (IARC, 2003). Estudos indicam um aumento no risco relativo de câncer de mama em 1,35% para mulheres que utilizaram cinco anos ou mais de TRH (NCI, 2008). O risco de câncer de mama parece aumentar com a combinação dos dois hormônios, estrogênio e progesterona (ACS, 2008a; NCI, 2008; ACS, 2007;). A densidade mamária pode ser constatada na mamografia e indica a quantidade de tecido glandular existente em relação ao tecido adiposo (ACS, 2007). Quanto maior a quantidade de tecido glandular e menor a quantidade de tecido adiposo, maior será a densidade mamária. Muitos estudos demonstram que a alta densidade mamária é um forte fator de risco para câncer de mama, sendo que mulheres que possuem níveis altos de densidade mamária podem apresentar risco de 4 a 6 vezes maior de desenvolver câncer de mama se comparadas a mulheres com densidades mamárias mais baixas (ACS, 2007). A TRH aumenta a densidade mamária (Figura 5) e reduz a sensibilidade e especificidade da mamografia, podendo atrapalhar o diagnóstico da doença (McPHERSON *et al.*, 2000; HENDERSON; FEIGELSON, 2000).

Contudo, o câncer de mama diagnosticado em mulheres que utilizam TRH tende a ser clinicamente menos avançado que aquele diagnosticado em mulheres que nunca utilizaram a terapia; há evidências que TRH não aumenta a mortalidade por câncer de mama (McPHERSON *et al.*, 2000). Sendo assim, as mulheres devem considerar os reais benefícios e

os riscos da utilização da TRH, que se utilizada, deve ser prescrita na menor dose e no menor tempo de uso possível (ACS, 2007). Nos EUA, entre 2001 e 2004, houve redução das taxas de incidência de câncer de mama em 3,5% por ano e umas das principais causas para essa queda é a diminuição da utilização de TRH por mulheres em pós-menopausa (ACS, 2008b).

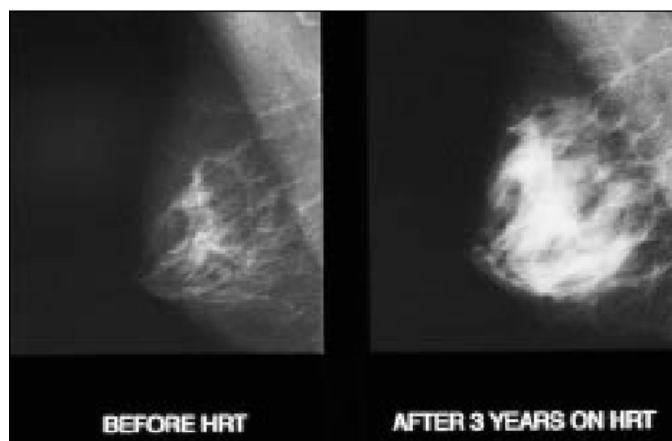


Figura 5. Mamografia de uma paciente antes e depois de três anos de uso de TRH, mostrando o aumento na densidade mamária causado pelo tratamento. Fonte: McPHERSON *et al.*, 2000.

- **História prévia de doença benigna de mama:** alguns tipos de doenças benignas de mama estão mais associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama que outros. As doenças benignas de mama são basicamente categorizadas em três grupos distintos: lesões não proliferativas, hiperplasias com ausência de atipias e hiperplasias com presença de atipias (ACS, 2007). As lesões não proliferativas de mama não estão associadas com câncer de mama. As hiperplasias com ausência de atipias (crescimento excessivo das células nos ductos ou lóbulos) aumentam o risco de câncer de mama em 1,5 a 2 vezes. Já as hiperplasias com presença de atipias (crescimento excessivo das células dos ductos ou lóbulos com presença de anormalidades celulares) apresentam um forte efeito no risco de câncer de mama, aumentando-o em 4 a 5 vezes (ACS, 2007; IARC, 2003; McPHERSON *et al.*, 2000). Mulheres com hiperplasia ou hiperplasia atípica de mama e com histórico familiar de câncer de mama possuem um risco 9 vezes maior de desenvolver a doença (ACS, 2007;

McPHERSON *et al.*, 2000). Mulheres com cistos palpáveis, fibroadenomas, papilomas ductais e hiperplasia epitelial moderada possuem risco de câncer de mama um pouco mais elevado - 1,5 a 3 vezes maior - que mulheres que não apresentam essas alterações, sendo que essas alterações, no entanto, não são clinicamente significativas (McPHERSON *et al.*, 2000).

• **Radiação:** a exposição à radiação ionizante seja ela natural, industrial, medicinal ou advinda de outras fontes, pode danificar o DNA e causar desordens celulares que podem levar à proliferação incontrolada de células o que, por sua vez, pode levar ao aparecimento de variados tipos de câncer, incluído o de mama (IARC, 2003). Em sobreviventes das bombas atômicas de Hiroshima e Nagasaki (expostos principalmente a raios γ) e em mulheres que receberam radiação terapêutica na parte superior do corpo, foi constatado um aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de cânceres sendo que o de mama um dos principais. A significância desse risco, no entanto, não é clara (NCI, 2008; IARC, 2003). McPHERSON *et al.* (2000) relataram que as adolescentes expostas à radiação durante a Segunda Guerra Mundial apresentaram o dobro de risco de desenvolver câncer de mama e que a exposição prolongada à radiação ionizante (raios γ e X), particularmente quando essa exposição ocorre durante a formação das mamas, também confere um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama. Sugere-se ainda que o aumento na sensibilidade à radiação possa ser uma das causas da susceptibilidade ao câncer de mama em indivíduos que apresentam mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*; como os portadores são heterozigotos para essas mutações, talvez a radiação provoque uma segunda mutação somática na cópia normal do gene (NCI, 2008). É também possível que exposições à radiação para fins de diagnóstico (incluindo a mamografia) e tratamento, aumentem o risco de pessoas com susceptibilidade genética. Porém, estudos realizados para avaliar o impacto das mamografias e da exposição peitoral a raios-X em pessoas portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentaram

resultados controversos (NCI, 2008). Quanto à radiação ultravioleta (UV), a exposição moderada aos raios UV solares, em horários apropriados, é essencial para a produção de vitamina D pelo organismo humano; a baixa taxa de vitamina D está associada ao aumento do risco de câncer de mama (ACS, 2008b)

• **Dieta e obesidade:** O excesso de peso e a obesidade também são graves fatores de risco para o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, dentre eles o câncer de mama (ACS, 2008a). O risco de câncer de mama aumenta para mulheres em fase de pós-menopausa que possuem índice de massa corpórea (IMC) acima do normal (>25). Isso ocorre devido ao aumento proporcional dos níveis séricos de estrona e estradiol – a produção do estrogênio circulante em mulheres em pós-menopausa ocorre primeiramente a partir do tecido adiposo (Figura 6). O mesmo não ocorre para mulheres em fase de pré-menopausa, nas quais o risco de câncer de mama diminui ligeiramente com alto IMC, o que pode ser explicado devido ao fato de que altos IMCs antes da menopausa estão relacionados com a menor quantidade de ciclos menstruais e ciclos anovulatórios (devido à gravidez e lactação), os quais estão associados à diminuição do risco de câncer de mama (KELLEN *et al.*, 2008; NCI, 2008; ACS, 2007; IARC, 2003; KEY, 1999). A dieta também afeta a recorrência da doença e mortalidade em mulheres com câncer de mama: aquelas que tiveram aumento de IMC após o diagnóstico estão sob maior risco quando comparadas a mulheres que mantiveram o IMC. Além disso, mulheres que consomem uma dieta rica em gordura também estão sob maior risco, independentemente na fase de menopausa em que são diagnosticadas (KELLEN *et al.*, 2008).

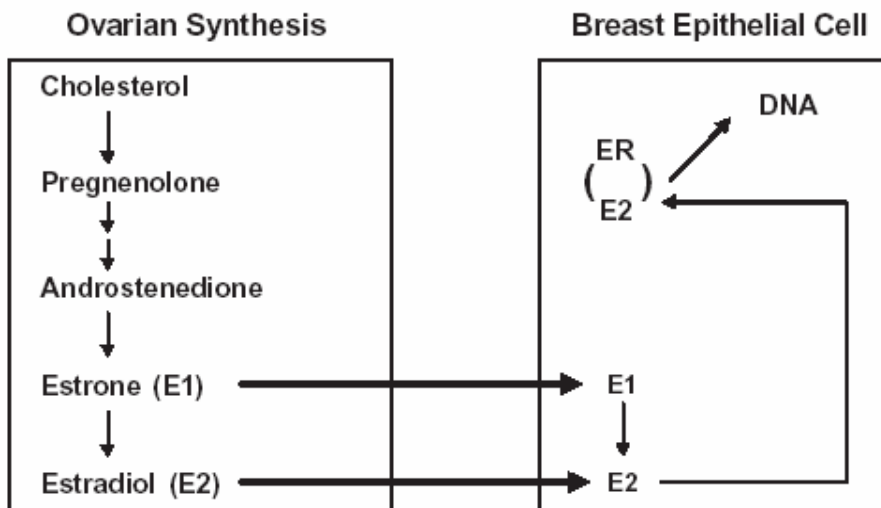


Figura 6. Metabolismo do estrogênio nos ovários e no tecido epitelial da mama a partir de colesterol. Adaptado de: FEIGELSON; HENDERSON, 2000.

Um dos elementos chave para explicar esses fatos são os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), uma família de hormônios peptídicos que refletem o excesso de energia ingerida. O IGF-1 está envolvido na estimulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular em certos locais como na mama, próstata, cólon e pulmão, sendo que em alguns tipos de cânceres e em células cancerígenas que apresentam alto poder de metástase, esse fator de crescimento está superexpresso (IARC, 2003). As concentrações de insulina e IGF-1 estão intimamente ligadas ao balanço energético e ao estado nutricional do organismo (a bioativação de IGF-1 é aumentada pela insulina): pessoas obesas ou que realizam exercícios físicos não periódicos possuem níveis elevados de IGF-1 enquanto pessoas com estado nutricional normal ou que realizam exercícios regularmente apresentam níveis baixos de IGF-1 (IARC, 2003). Estrógenos podem aumentar o poder de proliferação celular do IGF-1 em células mamárias cancerígenas e o IGF-1 por sua vez pode estimular fortemente a expressão de receptores de estrogênio em células da mama (IARC, 2003).

Há indícios experimentais que os ácidos graxos polinsaturados, ricos em ácido linoléico, contribuem para a progressão do câncer de mama, enquanto os ácidos graxos ômega-3, principalmente provenientes de peixe, apresentam efeito protetor para a doença; micronutrientes como β -caroteno e vitaminas C e E também possuem efeito protetor para a doença, sendo que a combinação de dieta rica em vegetais e frutas e atividade física está associada com a diminuição da mortalidade e recorrência em mulheres com câncer de mama (KELLEN *et al.*, 2008).

- **Atividade Física:** a atividade física regular (45 a 60 minutos por dia, 5 ou mais dias na semana) tem efeito protetor uma vez que reduz o risco de câncer de mama (ACS, 2008a; ACS, 2007). Esse efeito pode ser explicado por alguns fatos que relacionam a atividade física regular aos ciclos ovulatórios: retarda a idade de menarca (primeira menstruação), reduz a frequência dos ciclos ovulatórios e reduz os hormônios ovarianos circulantes – progesterona e estradiol (KELLEN *et al.*, 2008). Há muitos trabalhos que correlacionam profissões que requerem alta atividade física (atletas e bailarinas) com redução de ciclos ovulatórios, amenorréia (ausência de menstruação), menarca retardada e diminuição no risco de câncer de mama (THUNE *et al.*, 1997; BERNSTEIN *et al.*, 1994; BULLEN *et al.*, 1985; FRISCH *et al.*, 1980; FEICHT *et al.*, 1978). A atividade física possui um efeito protetor contra a mortalidade por câncer de mama e esse benefício é maior para mulheres que realizam exercícios físicos, como caminhada, de três a cinco horas por semana (KELLEN *et al.*, 2008). O sedentarismo é um fator de risco para o câncer de mama (NCI, 2008).

- **Álcool:** a ingestão de álcool é consistentemente associada ao aumento de risco de câncer de mama; a ingestão de 24 g de álcool por dia (equivalente a uma dose de 50ml de uísque ou vodca) pode aumentar o risco de câncer de mama em 21%, e este aumento é dose/tipo dependente (ACS, 2007). Segundo o “*National Cancer Institute*” – NCI (2008), o

risco de câncer de mama aumenta aproximadamente 10% para cada 10g de álcool ingeridos diariamente. Os mecanismos biológicos sobre o efeito do álcool no desenvolvimento do câncer têm sido amplamente discutidos; sabe-se que o álcool altera a via de metabolização do folato e aumenta os níveis endógenos de estrogênio, que são fatores de risco conhecidos para câncer de mama (KELLEN *et al.*, 2008; MORCH *et al.*, 2007; ACS, 2007). Além disso, o metabolismo do álcool aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, peróxidos, acetaldeído e outros agentes tóxicos que podem influenciar vários estágios do desenvolvimento do câncer de mama (MORCH *et al.*, 2007). Do total de casos de câncer atribuídos ao álcool em mulheres, aproximadamente metade são de mama (IARC, 2003).

- **Tabagismo:** os estudos são bastante controversos quanto ao tabagismo. Dos mais de 50 agentes carcinogênicos encontrados na fumaça do cigarro, aproximadamente 20 substâncias estão listadas como carcinógenos mamários pela “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC) (BETTS, 2007). Numerosos estudos demonstraram que substâncias tóxicas do cigarro reagem com o tecido mamário em ratos, podendo formar aductos no DNA, e que representam o primeiro passo para o processo carcinogênico (BETTS, 2007). Porém, os tumores mamários originados em ratos não apresentam semelhança histopatológica com os tumores mamários humanos e isto sugere que deve haver apenas uma ligação modesta entre o tabagismo e o câncer de mama humano (BETTS, 2007). KELLEN *et al.* (2008) afirmam que o risco de câncer de mama está positivamente associado ao tabagismo no período entre a menarca e o nascimento do primeiro filho, sugerindo que a sensibilidade do tecido mamário aos carcinógenos provenientes do tabagismo é maior entre a adolescência e o início da vida adulta. Porém, dados desse mesmo trabalho (KELLEN *et al.*, 2008) demonstram que não há associação entre histórico positivo de tabagismo e mortalidade por câncer de mama ou recorrência da doença. Metabólitos decorrentes da fumaça do cigarro já

foram encontrados no fluído mamário de fumantes ativos, no entanto, paradoxalmente, observa-se que a fumaça do cigarro possui efeitos anti-estrogênicos; o tabagismo está inversamente associado (proteção) ao câncer do endométrio em mulheres em pós-menopausa, que é outro tipo de câncer dependente de estrógeno; uma possível explicação para o fato de o tabagismo mesmo assim estar associado ao câncer de mama, é que esse “efeito protetor” (pela diminuição nos níveis de estrogênio) seria contrabalanceado por outros mecanismos altamente danosos desencadeados pelo uso do cigarro (KELLEN *et al.*, 2008; REYNOLDS *et al.*, 2004; KROPP; CHANG-CLAUDE, 2002).

Alguns trabalhos relatam um aumento no risco de câncer de mama em fumantes passivos (ACS, 2008a). MORABIA *et al.* (1996) sugerem que ambos os fumantes, ativos e passivos, têm risco aumentado de câncer de mama, uma vez que os constituintes da fumaça do cigarro possuem influência direta e/ou indireta no processo carcinogênico mamário.

2.1.3. Detecção precoce de câncer de mama

As recomendações do Instituto Nacional de Câncer para a detecção precoce de câncer de mama incluem (INCA, 2004a):

- rastreamento por meio do exame clínico da mama, para todas as mulheres a partir dos 40 anos de idade, realizado anualmente;
- rastreamento por mamografia, para as mulheres com idade entre 50 e 69 anos, com intervalo máximo de dois anos entre os exames;
- exame clínico da mama e mamografia anual, a partir dos 35 anos, para as mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer de mama.

A “*American Cancer Society*” também recomenda algumas ações para a detecção precoce da doença como: auto-exame das mamas mensalmente, exame clínico das mamas

(anual para mulheres com 40 anos ou mais e a cada três anos para mulheres de 20 a 39 anos), mamografia anual para mulheres com mais de 40 anos e exame de ressonância magnética das mamas para mulheres que possuem alto risco (20-25% ou mais) de desenvolver câncer de mama (ACS, 2007). Nos EUA, entre 2001 e 2004, houve redução das taxas de incidência de câncer de mama em 3,5% por ano e muitos fatores ajudaram para essa queda, dentre esses principalmente, redução do uso de TRH por mulheres em pós menopausa e aumento da utilização de mamografia na prevenção ao câncer de mama (ACS, 2008b).

Mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama incluem (STRATTON; RAHMAN, 2008; ACS, 2007; INCA, 2004a):

- portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*;
- presença de histórico familiar com pelo menos um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com diagnóstico de câncer de mama abaixo dos 50 anos;
- presença de histórico familiar com pelo menos um parente de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) com diagnóstico de câncer de mama bilateral ou câncer de ovário, em qualquer faixa etária;
- presença de histórico familiar positivo para câncer de mama masculino;
- presença de histórico de diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia;
- aquelas que fizeram radioterapia na região peitoral entre 10 e 30 anos de idade;
- portadores das síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba e Peutz-Jeghers ou que possuem histórico familiar positivo para essas síndromes.

2.2. GENES E O CÂNCER DE MAMA

Genes que codificam proteínas participantes de vários processos biológicos cruciais para o organismo, como o controle do ciclo celular, a apoptose, os processos de reparo de DNA lesado, vias metabólicas hormonais e de xenobióticos, entre outros, ao apresentarem mutações, podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama. Alguns podem contribuir quase que totalmente para o aparecimento da doença, esses são conhecidos como genes de “alta penetrância” (envolvidos no câncer de mama familiar). Outros podem levar ao desenvolvimento da doença somente em conjunto com outros fatores de risco ou com outros genes mutados, esses são conhecidos como genes de “baixa penetrância”.

2.2.1. Genes de “alta penetrância”

Os genes de alta penetrância mais conhecidos e bem estudados no câncer de mama são os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações em ambos (mais de 2.000 mutações distintas já foram descritas) podem resultar na produção de proteínas truncadas que perdem suas funções ou decaimento de RNA. Considerando que o câncer de mama hereditário é uma condição autossômica dominante, a pessoa afetada pode ser portadora de um alelo normal, porém na maioria dos casos esse alelo normal é perdido, resultando em perda total da função. Esse mecanismo de ação sugere que *BRCA1* e *BRCA2* estejam na classe de genes supressores de tumor, uma vez que a perda da função de suas proteínas pode resultar no desenvolvimento de neoplasias (NCI, 2008; STRATTON; RAHMAN, 2008). O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17q12-21 e codifica uma proteína de 1.863 aminoácidos, já o *BRCA2* está localizado no cromossomo 13q e codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos e ambas estão envolvidas no processo de reparo de DNA (NCI, 2008). Os produtos protéicos dos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* participam do reparo das quebras duplas do DNA (DSB – *Double-Strand Break*) por recombinação homóloga (HR – *Homologous*

Recombination), interagindo entre si e com outra proteína, a RAD51, auxiliando no processo de pareamento do cromossomo homólogo e junção das extremidades quebradas (KUSCHEL *et al.*, 2002; GOODE *et al.*, 2002). As proteínas BRCA1 e BRCA2 também participam de outros mecanismos celulares importantes, tais como a regulação da expressão gênica, controle do ciclo celular e controle da estabilidade genômica (NCI, 2008). Em 45% das famílias com múltiplos casos de câncer de mama e, em 90% das famílias afetadas com câncer de mama e de ovário em conjunto, os genes *BRCA1* e *BRCA2* aparecem como os responsáveis (NCI, 2008). Esses dois genes também estão associados ao câncer de mama masculino, de ovário, de próstata, melanoma e de pâncreas (NCI, 2008). Em casos de câncer de mama esporádico também há ocorrência de mutações nesses genes, porém nesses casos, a mutação ocorre em células somáticas (NCI, 2008).

Outros genes de importância considerável para o câncer de mama são: *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), *TP53* (*tumor protein p53*), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), e *STK11* (*serine/threonine kinase 11*) (NCI, 2008).

2.2.2. Genes de “baixa penetrância”

Os genes de baixa penetrância estão atualmente recebendo grande atenção por parte da comunidade científica, uma vez que, os casos de câncer de mama familiar representam apenas cerca de 5 a 10% do total de casos de câncer de mama. São fortes candidatos a serem estudados aqueles que participam dos processos de reparo de DNA, de apoptose, de detoxificação e também dos processos envolvidos nas vias metabólicas de hormônios esteróides (FERREIRA; ROCHA, 2004). Dentre estes genes, podemos citar algumas famílias gênicas como as dos *CYPs* e *GSTs* (metabolização de hormônios esteróides), *RADs*, *XRCCs*, *XPDs* (reparo de DNA lesado), *SOD1* e *SOD2* (ou *MnSOD*), *COMT*, *NAT1* e *NAT2* (vias de detoxificação), entre outros.

São crescentes as evidências que demonstram que a predisposição genética ao câncer ocorre através da combinação de variantes de alto risco, com a ação de genes de baixa e média penetrância e uma pequena quantidade de genes de alta penetrância (HUNG *et al.*, 2005).

2.3. A INSTABILIDADE QUÍMICA DO DNA

A molécula de DNA não é estável e está constantemente sujeita à formação de lesões (alterações na estrutura química da molécula original). Estas alterações químicas são surpreendentemente diversas e resultantes de três causas principais: espontâneas, por produtos do metabolismo celular e ambientais (FERREIRA; ROCHA, 2004). Aquelas causadas por lesões espontâneas ocorrem devido à instabilidade das ligações químicas específicas dos nucleotídeos em condições fisiológicas de temperatura e pH e, as principais lesões espontâneas observadas são a desaminação de bases e a perda de bases púricas e pirimídicas (formação de sítios AP). As alterações causadas por produtos do metabolismo celular constituem uma ameaça constante à integridade do DNA e dentre eles estão as espécies reativas de oxigênio, como os radicais peróxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Já as alterações causadas por lesões ambientais são resultantes de interações da molécula do DNA com diferentes agentes físicos (radiações ionizantes - raios gama e raios X, luz ultravioleta - UV) e químicos (como quimioterápicos, agentes alquilantes e xenobióticos) (FERREIRA; ROCHA, 2004). As células respondem aos danos causados ao DNA ativando um complexo de vias que inclui a senescência celular (parada do ciclo celular), ativação transcricional e pós-transcricional de uma série de genes, incluindo aqueles ligados ao reparo do DNA e, em algumas circunstâncias, a ativação do processo de apoptose (morte celular programada) (FERREIRA; ROCHA, 2004; GOODE, *et al.*, 2002; KHANNA; JACKSON, 2001).

2.4. REPARO DE DNA LESADO

Para assegurar a alta-fidelidade da transmissão da informação genética, as células desenvolveram mecanismos para o monitoramento da integridade genômica (GOODE *et al.*, 2002; KHANNA; JACKSON, 2001). Falhas nos mecanismos de reparo de DNA podem resultar no aumento da taxa de desenvolvimento de câncer. Está cada vez mais claro que deficiências nos processos de sinalização de danos do DNA e nas vias reparo dos mesmos, são fundamentais para a etiologia da maioria, se não de todos, os cânceres humanos (GOODE *et al.*, 2002; KHANNA; JACKSON, 2001).

Como já citado, o DNA está em constante risco de sofrer danos tanto por agentes endógenos como exógenos. Dentre eles podem ser citados (BOHR, 1995):

- a radiação UV, que tem sido um agente de grande interesse, por introduzir duas importantes “fotolesões” no DNA, o dímero ciclobutano e o fotoproducto 6-4, que estão diretamente ligadas ao desenvolvimento de câncer de pele;
- agentes alquilantes como o HN2 (do inglês *nitrogen mustard*);
- agentes carcinogênicos como a 4NQO (do inglês *4-nitroquinoline-N-oxide*) e a NAAF (do inglês *N-acetoxyacetyl-aminofluorene*) que também criam importantes lesões;
- alguns quimioterápicos usados no tratamento de câncer (como cisplatina), que criam danos diretos ao DNA, como aductos e ligações cruzadas na dupla fita;
- espécies reativas de oxigênio, agentes que criam lesões oxidativas no DNA e que, provavelmente representam a forma mais freqüente de lesões (despertam grande interesse devido ao fato de serem fortes iniciadores e/ou promotores de processos tumorais).

Um amplo número de mecanismos altamente complexos está envolvido na proteção do DNA contra danos, incluindo mecanismos de reparo de DNA e sistemas que protegem

contra o stress oxidativo e contra outros agentes danosos (SEEDHOUSE *et al.*, 2004; GOODE *et al.*, 2002).

Polimorfismos genéticos têm sido identificados em um número considerável de genes de reparo de DNA e de detoxificação (SEEDHOUSE *et al.*, 2004). Esses polimorfismos podem afetar a função da proteína, a atividade do promotor, a estabilidade do mRNA entre outros variantes, podendo resultar na inabilidade celular de responder aos danos do DNA, o que pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a vários tipos de cânceres (WEBB *et al.*, 2005; HUNG, *et al.*, 2005; SEEDHOUSE *et al.*, 2004; GOODE *et al.*, 2002).

2.4.1. Reparo por excisão de bases (BER) e o gene *XRCC1*

As lesões simples na fita de DNA, chamadas SSBs (do inglês *Single Strand Breaks*), são relativamente freqüentes (ex. desaminação de bases, perda de bases e nucleotídeos, mudanças tautoméricas, entre outras) e podem ser revertidas por enzimas específicas ou alternativamente, se esse mecanismo estiver inativo, o reparo por excisão de bases (BER – do inglês *base excision repair*) é acionado. No BER, a lesão é removida por uma enzima DNA glicosilase específica, criando um sítio abásico - AP (sítio apúrico ou apirimídico), e a ligação remanescente 5' fosfodiéster é quebrada pela ação de endonucleases (APE); logo após a DNA polimerase- β (com ajuda de outras proteínas incluindo *XRCC1*) adiciona um novo nucleotídeo à extremidade 3'-OH e excisa a base e o resíduo de fosfato livres; finalmente, o complexo DNA ligase III α /*XRCC1* sela a nova ligação – Figura 7 (BREM; HALL, 2005).

O gene *XRCC1* (do inglês *X-ray repair cross complementing protein 1*) está localizado no cromossomo 19q13.2 (Figura 8), possui 33 Kb de comprimento e codifica um transcrito de 2,2 Kb que corresponde a uma proteína de 633 aminoácidos que está envolvida no BER. Aparentemente, a proteína *XRCC1* não desempenha uma função enzimática, porém atua como proteína suporte, ligando-se e interagindo com várias outras enzimas participantes do

BER, como a DNA ligase III, a DNA polimerase β e a APE, e parece contribuir para a eficiência do processo bem como, para a estabilidade genômica após a ocorrência da lesão (SAADAT; ANSARI-LARI, 2008; SMITH *et al.*, 2008; BREM; HALL, 2005). Várias pesquisas moleculares e epidemiológicas estão sendo conduzidas a fim de encontrar possíveis associações entre polimorfismos desse gene e o risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer, inclusive o câncer de mama (BREM; HALL, 2005). Sugere-se que polimorfismos no gene *XRCC1*, que causam mudanças de aminoácidos, possam impedir a interação de *XRCC1* com outras proteínas enzimáticas e consequentemente alterar a atividade do sistema de reparo de DNA por BER (SAADAT; ANSARI-LARI, 2008).

Encontram-se amplamente descritos três polimorfismos (SNPs – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) para o gene *XRCC1* que resultam em alterações de aminoácidos: o primeiro, uma transição de C por T no códon 194 do éxon 6 resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Triptofano (*Arg194Trp* – rs1799782), o segundo é uma transição de G por A no códon 280 do éxon 9 que resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Histidina (*Arg280His* – rs25489) e o terceiro, uma transição de G por A no códon 399 do éxon 10, resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Glutamina (*Arg399Gln*, rs25487). Os polimorfismos *Arg399Gln* e *Arg194Trp* são os mais freqüentemente observados (SAADAT; ANSARI-LARI, 2008; WANG *et al.*, 2008; CHACKO *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2005). O polimorfismo *Arg399Gln* é o mais estudado e ocorre em um resíduo conservado do domínio de ligação da polimerase poli(ADP-ribose), sendo que o alelo A já foi associado significativamente a presença de alto nível de aductos de DNA, micronúcleo, trocas de cromátides irmãs, danos em cromossomos e ciclo celular prolongado (SAADAT; ANSARI-LARI, 2008). O polimorfismo *Arg194Trp* ocorre próximo à

região de ligação do antígeno nuclear de proliferação celular que é rica em prolina, serina e arginina/lisina (região polar) (WANG *et al.*, 2008).

Os mecanismos de reparo de DNA possuem funções vitais na preservação da estabilidade genômica. Variações genéticas em mecanismos de reparo podem contribuir para o desenvolvimento de câncer de mama (SMITH *et al.*, 2008). Acredita-se que os polimorfismos de *XRCC1* podem contribuir para um aumento no risco de câncer de mama, uma vez que modificam a eficiência da proteína XRCC1 e conseqüentemente a capacidade de reparo de DNA por BER (CHACKO *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2003; DUELL *et al.*, 2001).

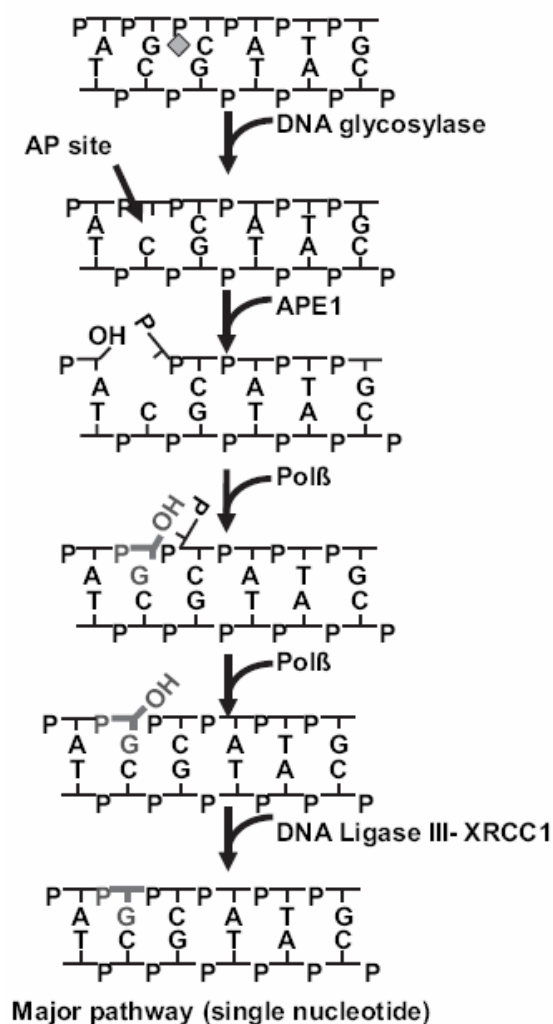


Figura 7. Mecanismo de reparo por excisão de bases (BER), onde atua XRCC1. Modificado de: HUNG *et al.*, 2005.

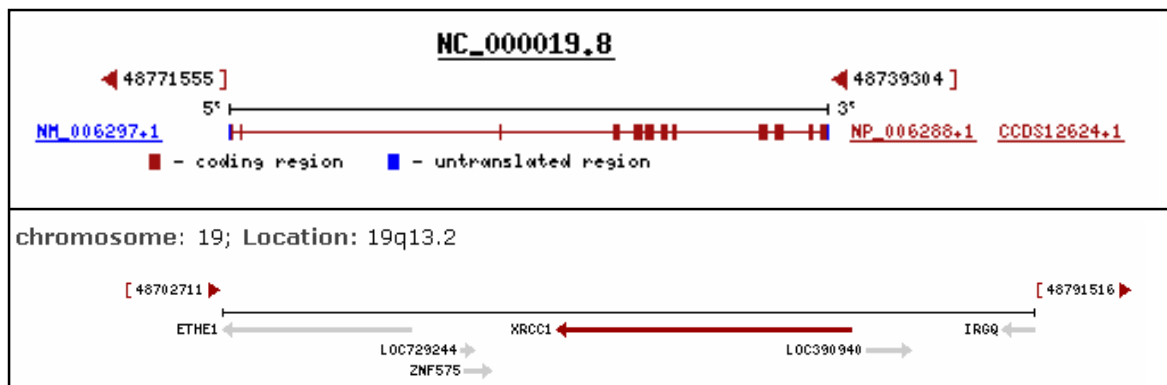


Figura 8. Representação do gene *XRCC1* e sua localização cromossômica. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7515&ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum. Acesso em: julho 2007.

2.5. PROCESSOS DE DETOXIFICAÇÃO

2.5.1. Espécies reativas de oxigênio e o gene *MnSOD*

As espécies reativas de oxigênio ou ROS (do inglês *Reactive Oxygen Species*) são geradas no metabolismo de xenobióticos, etanol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (cigarro), hormônios esteróides, e na própria respiração celular (TAMIMI *et al.*, 2004; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; BOHR, 1995).

As superóxidos dismutases (SODs) são uma família de enzimas que catalisa a conversão de ânions superóxidos (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), protegendo as células contra os danos induzidos pelos mesmos (MARTIN *et al.*, 2008; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; MILLKAN *et al.*, 2004). Há três isoformas conhecidas de SOD: a citosólica CuZnSOD (SOD1 – superóxido dismutase dependente de cobre e zinco), a extracelular CuZnSOD (SOD3) e a mitocondrial MnSOD (SOD2 – superóxido dismutase dependente de manganês). Essas três isoformas diferem pela estrutura que é homodimérica para CuZnSOD citosólica e homotetramérica para CuZnSOD extracelular e MnSOD (MARTIN *et al.*, 2008; GOTTLIEB *et al.*, 2005; MILLKAN *et al.*, 2004; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003). Considerando que a mitocôndria metaboliza

aproximadamente 95% do oxigênio celular, não possui histonas e possui um sistema de reparo de DNA ineficiente, ela é particularmente sensível aos danos oxidativos. A enzima MnSOD é a defesa primária da mitocôndria contra ROS, sendo considerada de grande importância para a defesa celular contra danos oxidativos e pode assim, desempenhar papéis importantes em doenças consideradas de início tardio como o câncer, diabetes e doenças do sistema nervoso central (MARTIN *et al.*, 2008; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

O gene *MnSOD* (do inglês *manganese superoxide dismutase*; nome oficial *SOD2*, do inglês *superoxide dismutase 2, mitochondrial*) está localizado no cromossomo 6q25 (MILLKAN *et al.*, 2004) - Figura 14 - e seu produto gênico é sintetizado no citosol sob forma de precursor que sofre modificação pós-transcricional para poder ser transportado para o interior da mitocôndria, onde atua (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; MILLKAN *et al.*, 2004). A sequência sinal de MnSOD é essencial para o processamento e transporte correto da enzima para a mitocôndria, sendo que a presença de polimorfismos nesta região podem afetar a distribuição de MnSOD (MARTIN *et al.*, 2008). Variações nos genes que codificam enzimas anti-oxidantes (como o *MnSOD*), em conjunto com a exposição ambiental à ROS, podem exercer um importante papel no desenvolvimento do câncer de mama (TAMIMI *et al.*, 2004). Como MnSOD é uma das principais enzimas que convertem diretamente ROS potencialmente danosas em metabólitos menos danosos (TAMIMI *et al.*, 2004), o estudo dos polimorfismos desse gene é muito importante, pois estes podem contribuir para uma menor eficiência da enzima codificada.

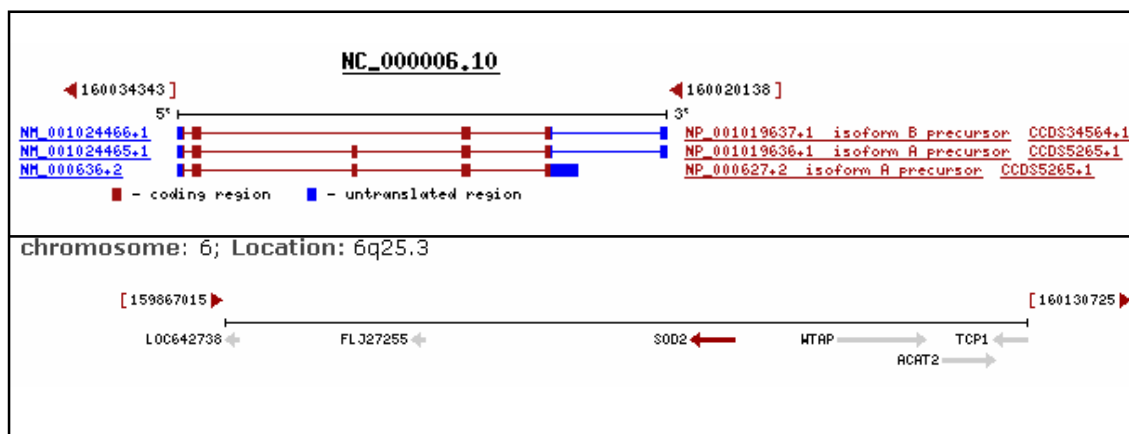


Figura 14. Representação do gene *MnSOD* e sua localização cromossômica. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6648&ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum. Acesso em: julho 2007.

Encontram-se bem descritos dois polimorfismos (SNPs) em *MnSOD*. Um deles envolve uma transição de C por T no códon 58, causando a substituição de um resíduo de isoleucina por um de treonina (*Ile58Thr*), porém este polimorfismo é raro na população (EGAN *et al.*, 2003). Um polimorfismo mais comum envolve a transição de T por C no códon 16 da sequência sinal, que resulta em substituição de um resíduo valina por um de alanina (*Val16Ala* rs4880) (MARTIN *et al.*, 2008; GOTTLIEB *et al.*, 2005; MILLKAN *et al.*, 2004; EGAN *et al.*, 2003). Acredita-se que essa substituição de aminoácidos possa resultar na alteração da estrutura secundária da proteína, de uma conformação α -hélice para β -pregueada ou ainda possa afetar a alocação intracelular da enzima e também o seu transporte para o interior da mitocôndria (MARTIN *et al.*, 2008; AMBROSONE *et al.*, 1999) e, consequentemente diminuir sua funcionalidade. O polimorfismo *Val16Ala* é mais conhecido como *Val-9Ala* – 16º códon da sequência sinal ou -9º aminoácido da proteína madura (GOTTLIEB *et al.*, 2005).

2.5.2. Catecol oestrogênio e o gene *COMT*

Os hormônios naturais oestrona e oestradiol estão bem reconhecidos como carcinógenos humanos e vários tipos de danos ao DNA induzidos por oestrogênio já foram detectados, tais como quebras de fita simples, hidroxilação de guaninas e aductos de DNA. Muitas dessas lesões são causadas por radicais livres liberados durante a metabolização desses hormônios e podem induzir mutações somáticas, resultando finalmente na formação tumoral (LIEHR, 2001).

Em ensaios de laboratório, em uma variedade de ratos e camundongos, provou-se que o oestradiol aumenta a incidência de tumores de mama, glândula pituitária, útero, cérvix, vagina, sistema linfático e ossos. Concentrações elevadas de oestrogênio no plasma, causados tanto pelo aumento na taxa de metabolização endógena como pelo uso de doses terapêuticas de estrógenos (medicamentos), aumentam o risco de câncer de mama e de útero em humanos (LIEHR, 2001; LIEHR, 2000).

Durante a metabolização de hormônios esteróides, grupos hidroxila (OH) podem se ligar aos intermediários formados, resultando em alteração da função biológica dos mesmos; o intermediário oestradiol (E_2) pode sofrer essa modificação através de duas vias: pela hidroxilação do anel aromático A, que resulta na formação de catecol oestrogênio – CE (catecol = anel aromático ligado a dois grupos hidroxila), ou hidroxilação do anel aromático D, que resulta na formação de 16 α -hidroxioestrona, porém, a via preferencial é a que resulta em CE (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003) (Figuras 15, 16 e 17). O CE pode apresentar duas conformações: o 2-hidroxioestradiol (2-OHE₂) ou o 4-hidroxioestradiol (4-OHE₂) (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

A enzima COMT possui função de detoxificação, pois catalisa a transferência de um grupo metil de um doador, a S-adenosil-L-metionina (SAM), para substratos contendo catecol

(CE, catecolaminas, entre outros), transformando esse substrato em um composto biologicamente inativo (TANAKA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2005). Essa estratégia de inativação de CE (2-OHE₂ ou 4-OHE₂) impossibilita a ligação deste ao seu receptor e conseqüentemente, impede que ele possa desempenhar suas funções normais (hormônios lipossolúveis, como os esteróides, necessitam de transportadores) (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003). O 4-OHE₂ produz uma grande quantidade de radicais livres, principalmente porque a enzima COMT catalisa preferencialmente a metilação de 2-OHE₂. Os catecóis estrogênicos particularmente o 4-OHE₂ podem apresentar efeitos mutagênicos diretos e indiretos (HOLT *et al.*, 2007).

Quando não há metilação, os CEs podem formar semiquinonas (CE-SQ) e quinonas (CE-Q); sabe-se que a CE-2,3Q pode ligar-se de forma estável ao DNA, enquanto que a CE-3,4Q pode formar aductos no DNA e esses eventos são possíveis desencadeadores de processos tumorais (HOLT *et al.*, 2007, MITRUNEN; HIRVONEN, 2003). Além disso, tanto a CE-SQ como a CE-Q podem entrar em processo de redução formando as ROS, que também podem vir a danificar o DNA (MITRUNEN; HIRVONEN, 2003).

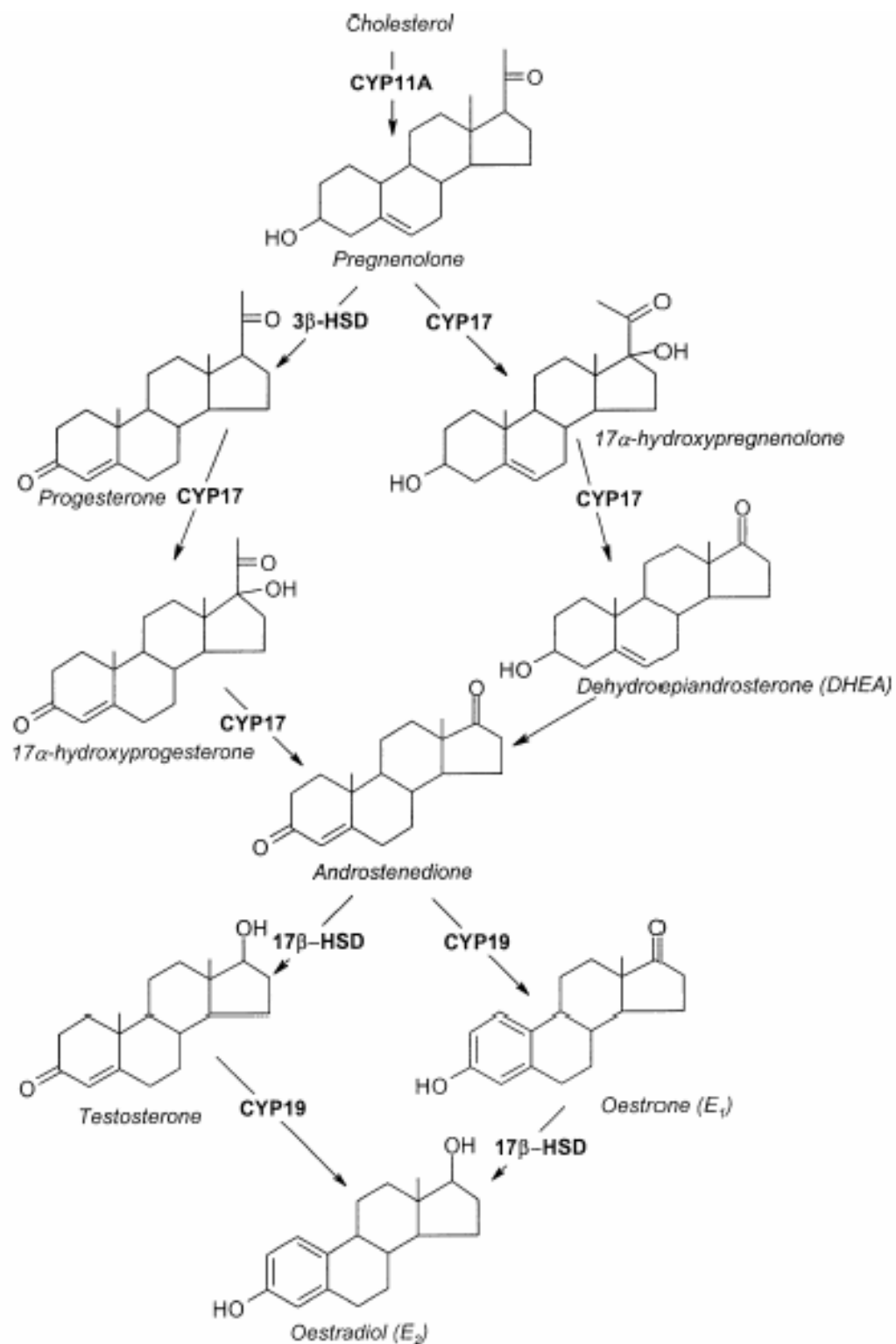


Figura 15. Metabolização de hormônios esteróides. Ação de várias enzimas (CYPs e HSDs). Fonte: MITRUNEN; HIRVONEN, 2003.

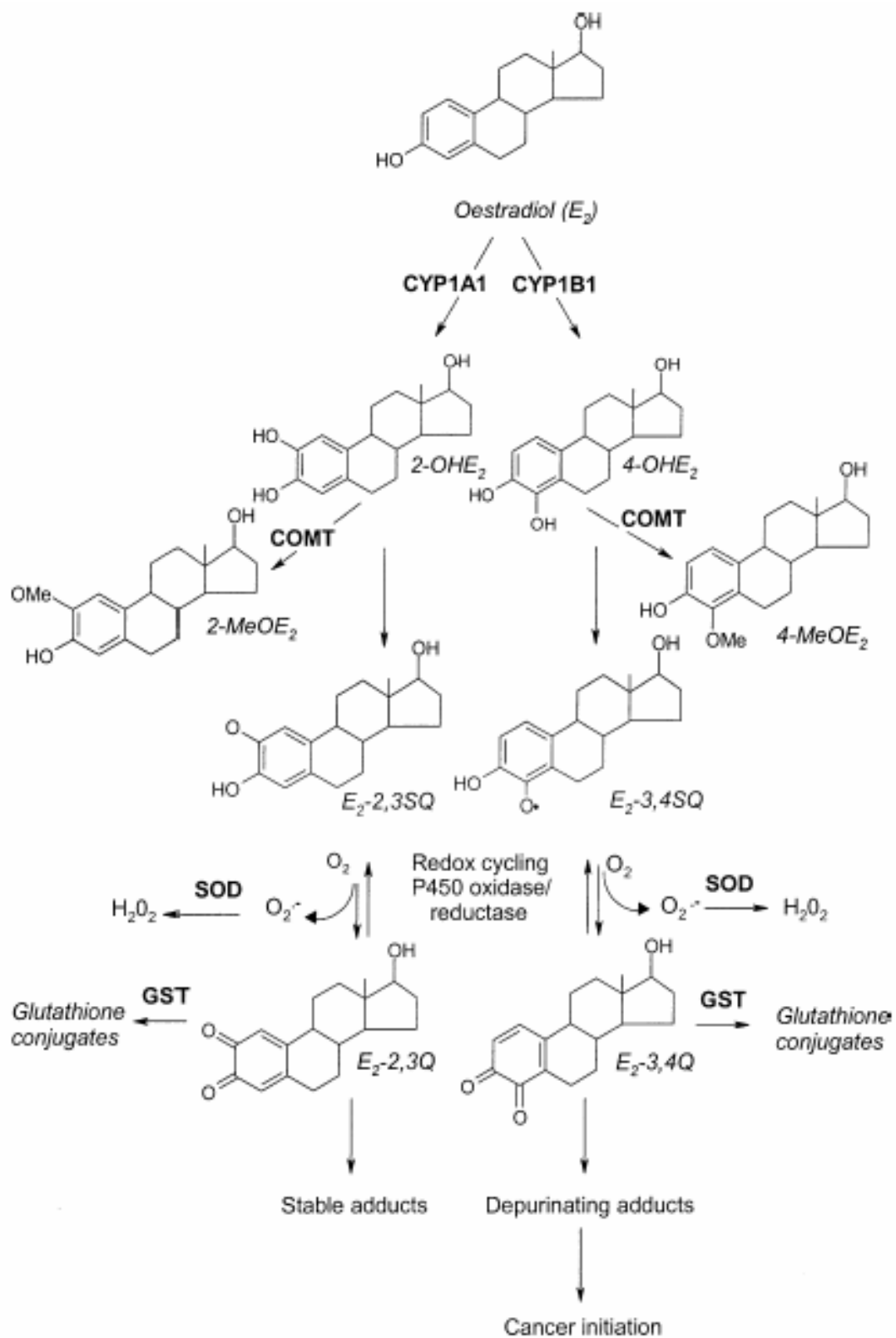


Figura 16. Continuação - Metabolização de hormônios esteróides. Formação de E_2 e ação de detoxificação das enzimas COMT, SOD e GST. Fonte: MITRUNEN; HIRVONEN, 2003.

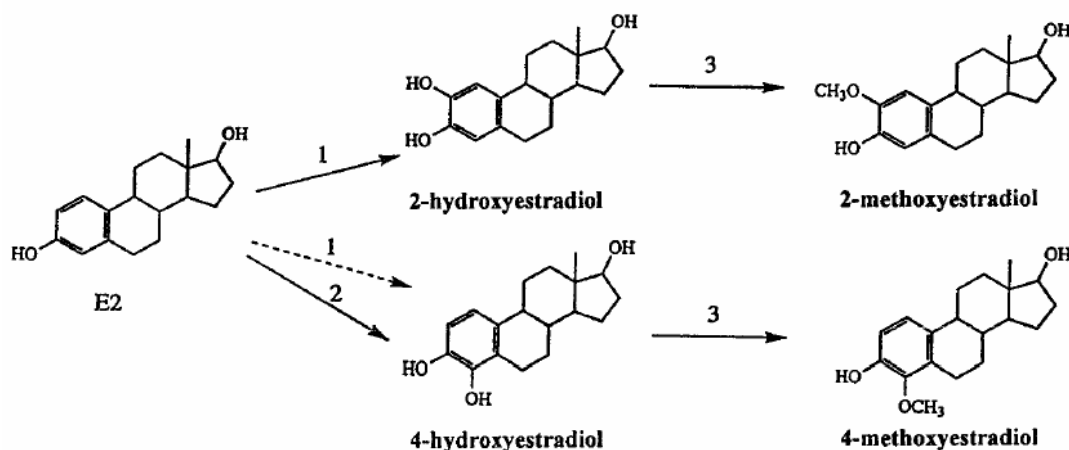


Figura 17. Em detalhe, a conversão de E₂ em catecolestrogênios. Enzimas do citocromo P450 hepático e extrahepático convertem E₂ preferencialmente em 2-hidroxiestradiol (1) e aproximadamente 15 a 20% em 4-hidroxiestradiol (2). Citocromo P450 do útero, glândulas mamárias e outros tecidos convertem E₂ preferencialmente em 4-hidroxiestradiol. Esses metabólitos são metilados pela COMT (3). Fonte: LIEHR, 2000.

HOLT *et al.* (2007) e LIEHR (2000) sugerem que, a conversão de E₂ a 4-HOE₂ pode desencadear a iniciação de processos tumorais uma vez que estes podem causar efeitos mutagênicos diretos e indiretos (formação de intermediários semiquinonas/quinonas, aductos de DNA e radicais livres); E₂ pode ainda induzir várias lesões cromossômicas e genéticas incluindo aneuploidias, aberrações cromossômicas, instabilidade na região de microssatélites, amplificação e mutações gênicas (LIEHR, 2000). HUBER *et al.* (2002) citam que o estradiol está envolvido na fisiopatologia de uma série de doenças como hipertensão, osteoporose, aterosclerose, e vários tipos de câncer como o de mama, cólon e próstata.

A proteína COMT – Catecol-*O*-Metiltransferase – é uma enzima que apresenta duas isoformas: uma solúvel (S-COMT, com 221 aminoácidos e 24,4 kDa) e outra acoplada à membrana (MB-COMT, com 271 aminoácidos e 30,0 kDa), sendo que S-COMT é expressa predominantemente na maioria dos tecidos, exceto no cérebro, onde 70% do total de enzimas COMT são do tipo MB-COMT (LI *et al.*, 2005; SELLERS *et al.*, 2005). As duas isoformas são codificadas pelo gene – *COMT* (do inglês *catechol-O-methyltransferase*), que está

localizado no cromossomo 22q11.2, possui 6 éxons (os dois primeiros não codificantes) e dois sítios diferentes de início da transcrição específicos para cada isoforma (dois códons iniciadores ATG distintos) localizados no éxon 3 – P1 para *S-COMT* e P2 para *MB-COMT* (TANAKA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2005; SELLERS *et al.*, 2005).

O gene *COMT* (Figura 18) apresenta os seguintes polimorfismos bem caracterizados: uma transição de G por A (SNP) no códon 158 do gene *MB-COMT* e também no códon 108 de *S-COMT*, que resultam em substituição de um resíduo de Valina por um de Metionina (*Val108/158Met* – rs4680), e estão ligados à menor atividade da enzima COMT. O alelo com a variante Metionina é comumente designado *L* (do inglês *low activity*) e aquele com Valina como *H* (do inglês *high activity*). O SNP *Val158Met* foi apontado em vários trabalhos científicos como sendo de importância para o desenvolvimento de câncer de mama. (MODUGNO *et al.*, 2005; SAZCI *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2003; MIYOSHI; NOGUCHI, 2003; MITRUNEN *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 1999; MATSUI *et al.*, 1999).

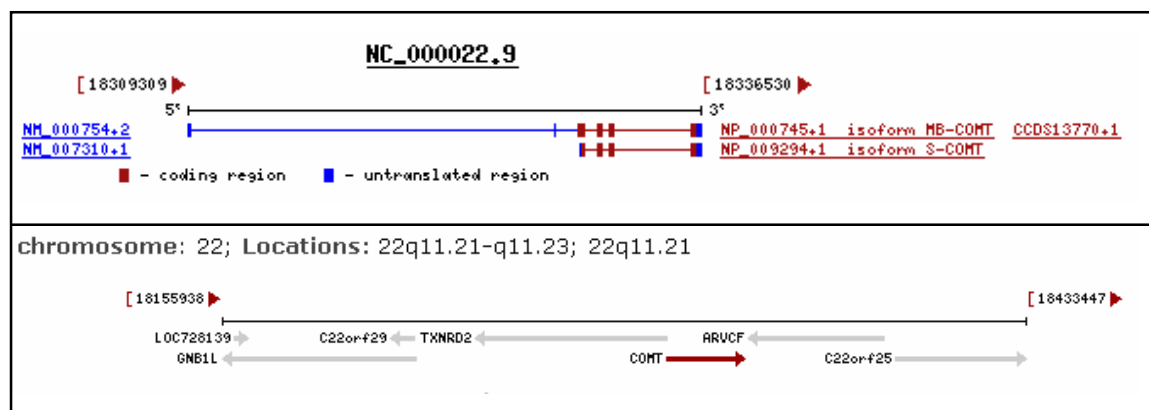


Figura 18. Representação do gene *COMT* e sua localização cromossômica. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1312&ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum. Acesso em: julho 2007.

O estrogênio possui diversas funções em humanos e possui um papel crítico no desenvolvimento de câncer de mama. Apesar de o gene *COMT* ser expresso constitutivamente, principalmente no cérebro, fígado e rins, ele também é expresso no tecido periférico, incluindo as células epiteliais de ductos e lóbulos mamários. A maior parte da detoxificação realizada pela enzima COMT ocorre no fígado, mas também pode ocorrer nesses tecidos periféricos, como no tecido mamário, onde foi observado que a expressão de *COMT* é elevada em tumores acoplados a este (ONAY, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

Observando dados epidemiológicos e estatísticos sobre o câncer de mama, podemos constatar que se trata de uma doença de importância mundial. Além dos prejuízos para a saúde pública, observam-se os danos psicológicos incalculáveis causados às mulheres acometidas pelo câncer de mama, que vêem o símbolo da afirmação de sua feminilidade e maternidade ser muitas vezes destruído por uma doença multifacetada.

Grandes são os esforços para melhoria no controle do câncer de mama, tanto no âmbito preventivo e diagnóstico como no terapêutico e cirúrgico. Apesar de grandes avanços terem sido realizados nos últimos anos, a luta contra o câncer de mama permanece, havendo ainda a necessidade de maior conhecimento sobre sua etiologia e seus fatores de risco. Portanto, torna-se essencial a criação e o aprimoramento de ferramentas de estudo que auxiliem no desenvolvimento dessas áreas.

Nesse contexto, a utilização de marcadores genéticos como os SNPs, merece atenção como possíveis ferramentas para diagnóstico, prognóstico e detecção de fatores de risco do câncer de mama, por fornecerem informações de maior poder resolutivo e precisão, podendo auxiliar na melhoria da qualidade de vida de muitas mulheres, além de contribuírem para o entendimento do caráter multifatorial da doença.

O desenvolvimento de vários tipos de câncer, dentre esses o de mama, é comumente causado pelo acúmulo da instabilidade genômica. Considerando a grande importância dos mecanismos de reparo de DNA e de detoxificação para a manutenção da integridade genômica, torna-se claro o envolvimento destes na tumorigênese humana. Sendo assim, é relevante a investigação de polimorfismos que possam alterar a integridade dessas vias e que possam, no futuro, ser utilizados como marcadores genéticos para o câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar polimorfismos em genes de reparo de DNA e detoxificação bem como características clínicas e epidemiológicas, em mulheres diagnosticadas com câncer de mama e mulheres saudáveis do Estado de Santa Catarina em um estudo caso-controle, no intuito de investigar a possível associação destes com o câncer de mama e a possibilidade futura de utilização dos mesmos como marcadores de susceptibilidade à doença.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um banco de DNA da população amostrada, composta por pacientes diagnosticadas com câncer de mama e indivíduos saudáveis (grupo controle) no Estado de Santa Catarina.
- Estabelecer um banco de dados de DNA baseado nas análises moleculares que serão realizadas na população amostrada.
- Estabelecer um banco de dados clínico e epidemiológico, baseado em questionário realizado com essa população.
- Identificar a frequência dos polimorfismos do gene de reparo de DNA:
 - *XRCC1* (*Arg194Trp*)
 - *XRCC1* (*Arg399Gln*) na população amostrada e verificar a possível correlação desses com a susceptibilidade ao câncer de mama.
- Identificar a frequência dos polimorfismos dos genes de detoxificação:
 - *MnSOD* (*Val-9Ala*);
 - *COMT* (*Val158Met*) na população amostrada e investigar suas relações com a susceptibilidade ao câncer de mama.

- Identificar possíveis associações entre os alelos dos polimorfismos analisados e o risco de desenvolvimento câncer de mama, através de análises estatísticas apropriadas. Tais associações podem indicar a futura aplicação destes polimorfismos como marcadores de susceptibilidade genética, úteis para prevenção, diagnóstico e prognóstico de câncer de mama.

- Investigar a relação de alguns dados clínicos e epidemiológicos (idade de menarca, idade de menopausa, idade da primeira gestação, amamentação, uso de contraceptivos, uso de terapia de reposição hormonal, tabagismo, entre outros) com a susceptibilidade ao câncer de mama.

- Propor modelos de interação entre os polimorfismos tipo SNP e os dados epidemiológicos e clínicos estudados e o câncer de mama, que possam melhor ser adotados para justificar estas associações.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ESTUDO POPULACIONAL

Esse estudo foi parte integrante de um projeto mais abrangente intitulado “Câncer de Mama: Avaliação de Parâmetros Informativos e Moleculares para Diagnóstico e Prognóstico no Estado de Santa Catarina”, submetido e aprovado:

- pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), no parecer nº 349/05, de 26/06/2006;
- pelo CEP da Maternidade Carmela Dutra em 20 de Julho de 2007;
- e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob parecer nº. 027/2006 e registro 13312, de 24 de Janeiro de 2007.

A amostra populacional foi constituída por 310 mulheres do Estado de Santa Catarina separadas em dois grupos distintos:

- 162 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, não submetidas à quimioterapia ou radioterapia atendidas no Hospital Universitário (HU) da UFSC e na Maternidade Carmela Dutra;
- 148 mulheres saudáveis, submetidas a exames de rotina no laboratório de análises clínicas e doadoras do banco de sangue do HU, voluntárias do Hospital Florianópolis e alunas do Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC.

Estas mulheres foram esclarecidas sobre os objetivos do projeto e sigilo das informações, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, permitindo a coleta de material biológico e a realização de um questionário para coleta de dados pessoais, epidemiológicos e clínicos (Anexos A e B).

Foram coletadas 310 amostras de sangue periférico, sendo que 162 eram de mulheres portadoras de câncer de mama (sem tratamento quimioterápico e/ou radioterápico prévio) e

148 de mulheres saudáveis não portadoras de câncer de mama e sem histórico de parentes de primeiro grau (mãe, irmã e filha) afetados pela doença. Foi realizada extração de DNA das 310 amostras de sangue periférico, porém devido à qualidade insatisfatória de algumas amostras de DNA e problemas com as técnicas de PCR-RFLP, esse número pode variar nas análises dos polimorfismos. Todas as portadoras de câncer de mama e 135 das 148 mulheres sem a doença responderam os questionários, porém devido à falta de informações em alguns questionários, o número de indivíduos em cada dado analisado pode variar. O grupo de mulheres portadoras de câncer de mama foi denominado “Casos” e o grupo com mulheres não portadoras da doença de “Controles”.

5.2. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletados 8ml de sangue periférico em Vacutainer® com anticoagulante EDTA tanto das pacientes como do grupo controle. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm (centrífuga *excelsa II* modelo 206BL para 8 tubos de 8 a 15ml), durante 20 minutos, para separação do plasma, da camada de leucócitos (*buffy coat*) e das hemácias, os quais foram estocados a – 20°C, para posterior utilização.

5.3. EXTRAÇÃO DE DNA

Cada indivíduo recebeu um número em série de acordo com a data de entrada no banco de DNA e esse número foi utilizado para todos os procedimentos e análises moleculares.

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o *buffy coat*, de acordo com o método proposto por SAMBROOK (2001).

O método proposto por SAMBROOK (2001) consiste no rompimento mecânico-químico das células, degradação de proteínas, precipitação e purificação do DNA que se mantém conservado. Em microtubos de 1,5ml adiciona-se 50µl de *buffy coat* e 300µl de

tampão de extração SEB (“*Stain Extraction Buffer*”) (Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 10mM pH 8,0; NaCl 100mM; SDS 2%) para lise da membrana e organelas celulares e 10µl de Proteinase K (20 mg/ml), uma protease que cliva ligações peptídicas permitindo a remoção de proteínas. O conteúdo é então homogeneizado em vórtex e levado ao banho-maria por 12 h a 65°C. Após esse período é adicionado aos microtubos 300µl de Clorofane (Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico) que são homogeneizados em vórtex e centrifugados por 7 min a 12.000 rpm (centrífuga *eppendorf* 5415D, rotor F-45-24-11 de ângulo fixo de 45° para 24 tubos de 1,5 a 2ml com diâmetro máximo de 11 mm). Após a centrifugação o sobrenadante é recuperado e transportado para novos microtubos. Adiciona-se então 300µl de clorofórmio aos microtubos, homogeneíza-se em vórtex e centrifuga-se por 7 min a 12.000 rpm. O sobrenadante é recuperado e transportado para novos microtubos, onde são adicionados álcool isopropílico absoluto em volume equivalente ao volume da amostra e acetato de sódio (3M) em volume equivalente a 10% do volume da amostra. O conteúdo dos microtubos é homogeneizado por inversão e levado ao freezer (4 °C) por 1 hora. Após esse período centrifuga-se os microtubos por 10 min a 13.000 rpm e 0 °C (centrífuga *eppendorf* 5415R, Rotor de ângulo fixo FA-45-24-11 de 45° para 24 tubos de 1,5 a 2 ml com um diâmetro máximo de 11 mm). O sobrenadante é então descartado e adiciona-se aos microtubos 300µl de etanol 70%, homogeneíza-se em vórtex e centrifuga-se por 2 min a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante é descartado e repete-se esse último passo. Os microtubos são levados ao banho-seco por 1 hora a 65°C e após esse período adiciona-se 100µl tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 0,1mM; pH 7,5) para solubilização do DNA.

Após a extração, os ácidos nucleicos extraídos de cada amostra foram dosados em espectrofotômetro a 260 nm. Com esses dados foram preparadas soluções de uso de DNA a 20ng/µl, utilizando-se tampão TE.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade do DNA extraído (Figura 19).

As amostras foram armazenadas a -20 °C para as futuras análises moleculares.

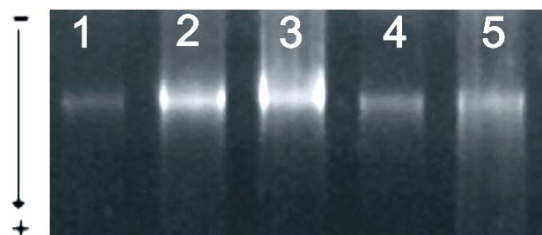


Figura 19. Foto da eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de integridade do DNA extraído. 1- marcador K562; 2, 3, 4 e 5- amostras de DNA extraído pelo método proposto por SAMBROOK (2001)

5.4. PCR-RFLP

Foi realizada amplificação de seqüências-alvo específicas dos genes pela técnica PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam as regiões gênicas de interesse (Tabela 3). Os polimorfismos de sítios de restrição (RSPs, do inglês *Restriction Site Polymorphism*) resultam em alelos que possuem ou não um sítio de restrição específico e podem ser analisados pela digestão com a endonuclease de restrição relevante (STRACHAN; READ, 2002). Os RFLPs resultantes possuem dois alelos correspondendo à presença ou à ausência desse sítio de restrição, gerando fragmentos de restrição cujos tamanhos são característicos dos dois alelos, podendo assim serem identificados (STRACHAN; READ, 2002).

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR-RFLP

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Referência
<i>XRCC1</i> <i>Arg194Trp</i>	5' –GCC CCG TCC CAG GTA AG- 3' 5' –AGC CCC AAG ACC CTT TCA CT- 3'	CHAN <i>et al.</i> , 2005
<i>XRCC1</i> <i>Arg399Gln</i>	5' -TTG TGC TGC TTT CTC TGT GTC CA- 3' 5' -TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA- 3'	ABDEL-RAHMAN <i>et al.</i> , 2000
<i>MnSOD</i> <i>Val-9Ala</i>	5' -ACC AGC AGG CAG CTG GCG CCG G- 3' 5' -GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG- 3'	CAI <i>et al.</i> , 2004
<i>COMT</i> <i>Val158Met</i>	5' -TAC TGT GGC TAC TCA GCT GTG C- 3' 5' -GTG AAC GTG TGT TGA ACA CC- 3'	DOHERTY <i>et al.</i> , 2005

Os reagentes utilizados para as reações de PCR estão relacionados na Tabela 4. Para cada PCR foi utilizado um controle negativo (CN) com água no lugar do DNA genômico para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação e um controle positivo (CP) que consistiu em uma amostra já previamente otimizada para a reação. As reações de PCR foram conduzidas nos termocicladores Eppendorf Mastercycler® e MJ-Biocyler para a amplificação da região gênica de interesse, os programas aos quais cada PCR foi submetida estão listados na Tabela 5.

Tabela 4. Protocolos para as reações de PCR.

Reagentes	<i>XRCC1</i> <i>Arg194Trp</i>	<i>XRCC1</i> <i>Arg399Gln</i>	<i>COMT</i> <i>Val158Met</i>	<i>MnSOD</i> <i>Val-9Ala</i>
Tampão 10X	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
MgCl₂ 50mM	1,0µl	1,25µl	1,5µl	1,5µl
dNTP 10mM	0,5µl	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Iniciador F 50µM	0,5µl	0,3µl	0,1µl	0,1µl
Iniciador R 50µM	0,5µl	0,3µl	0,1µl	0,1µl
Água ultra-pura	15,8µl	15,95µl	16,1µl	16,1µl
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,2µl	0,2µl	0,2µl	0,2µl
DNA (20ng/ µl)	4,0µl	4,0µl	4,0µl	4,0µl
Volume Total	25µl	25µl	25µl	25µl
Tamanho do fragmento amplificado (pb)	491	615	236	107

Tabela 5. Programas utilizados para as reações de PCR

Gene	Programas
<i>XRCC1</i> <i>Arg194Trp</i>	1 ciclo: 95°C por 5 min 35 ciclos: 95 °C por 45 seg, 62 °C por 45 seg e 72°C por 45 seg 1 ciclo 72 °C por 5 min
<i>XRCC1</i> <i>Arg399Gln</i>	1 ciclo: 95°C por 5 min 30 ciclos: 94 °C por 30 seg, 62 °C por 1 min e 72°C por 45 seg 1 ciclo 72 °C por 5 min
<i>COMT</i> <i>Val158Met</i>	1 ciclo: 95°C por 2 min 40 ciclos: 94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72°C por 2 min 1 ciclo 72 °C por 5 min
<i>MnSOD</i> <i>Val-9Ala</i>	1 ciclo: 95°C por 15 min 35 ciclos: 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72°C por 30 seg 1 ciclo 72 °C por 7 min

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% (100V, 20 min). Para a eletroforese foi utilizado: tampão TBE 0,5X (50ml de TBE 10X; 950ml de água) para preparação do gel e corrida eletroforética e tampão de aplicação (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% glicerol em H₂O). Após a corrida o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (1µg/ml) para visualização da região gênica amplificada sob luz UV. O gel foi fotodocumentado e analisado. Em caso de sucesso da reação de PCR, as amostras foram submetidas à clivagem por endonuclease de restrição.

5.5. DIGESTÃO POR ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Para detecção dos SNPs a serem analisados, utilizaram-se endonucleases de restrição específicas (Tabela 6). Os reagentes utilizados estão relacionados na Tabela 7. Essa mistura foi alíquotada em microtubos de 0,2ml onde se adiciona o produto da PCR de cada amostra. Em seguida, incubou-se em banho-maria em temperatura e tempo específicos para cada enzima de restrição conforme as condições descritas na Tabela 6.

Os produtos da reação de clivagem por enzima de restrição foram analisados em gel de agarose ou poliacrilamida. Para a análise em gel de agarose foram utilizados 5µl de produto da reação misturados a 2µl de tampão de aplicação; o gel foi então submetido à corrida

eletroforética (Tabela 6), corado em solução de brometo de etídio (1 µg/ml), fotodocumentado e analisado. O gel de poliacrilamida foi preparado com solução mãe 29:1 (proporção acrilamida:bisacrilamida), tampão TBE 10X (90 g de Tris base; 18g de Tris-HCl; 55g de ácido bórico; 40ml de EDTA 0,5M; volume em água para 1L; pH 8,0), água destilada, persulfato de amônio e TEMED (tetrametiletilenodiamina); foi realizada pré-corrida eletroforética a 200V por 1,5 horas. Foram utilizados 12µl de produto da reação misturados a 2µl de tampão de aplicação; o gel foi então submetido à corrida eletroforética (Tabela 6), corado em solução de nitrato de prata, fotodocumentado e analisado. Os padrões de restrição das endonucleases para cada SNP que foram analisados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Características das enzimas de restrição utilizadas nas reações de RFLP, protocolos para utilização das mesmas, protocolos para eletroforese em gel de agarose e tamanho dos fragmentos originados após a RFLP.

	XRCC1 <i>Arg194Trp</i>	XRCC1 <i>Arg399Gln</i>	COMT <i>Val158Met</i>	MnSOD <i>Val-9Ala</i>
Enzima de Restrição	<i>MspI</i> (NEB)	<i>MspI</i> (NEB)	<i>NlaIII</i> (NEB)	<i>NgoMIV</i> (NEB)
SNP	C → T	G → A	G → A	T → C
Sítio de Restrição	C↓CGG	C↓CGG	CATG↓	G↓CCGGC
Tempo	12h	16 h	12 h	12 h
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Concentração do Gel	10% (poliacrilamida)	2% (agarose)	5% (agarose)	5% (agarose)
Corrida eletroforética	200V por 3 h	90V por 30 min	90V por 50 min	90 V por 1 h
Fragmentos de Restrição (pb)	CC: 293, 178 e 20 CT: 313, 293, 178 e 20 TT: 313 e 178	GG: 221, 374 e 20 GA: 221, 374, 20 e 615 AA: 615	GG: 114, 54, 41 e 27 GA: 114, 96, 54, 41, 27 e 18 AA: 96, 54, 41, 27 e 18	CC: 107 CT: 107, 89 e 18 TT: 89 e 18

Tabela 7. Protocolos para as reações de clivagem por enzima de restrição.

Reagentes	XRCC1 194 <i>Arg194Trp</i>	XRCC1 <i>Arg399Gln</i>	COMT <i>Val158Met</i>	MnSOD <i>Val-9Ala</i>
Tampão	1,75µl (NEB2)	1,75µl (NEB2)	1,5µl (NEB4)	1,9µl (NEB4)
BSA	-	-	0,2µl	-
Enzima de restrição	0,25µl (5U)	0,25µl (5U)	0,25µl (2,5U)	0,1µl (1U)
Água ultra-pura	4,0µl	4,0µl	4,05µl	4,0µl
Produto da PCR	6,0 µl	6,0 µl	6,0 µl	6,0 µl
Volume Total	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

As Figuras 20 e 21, 22, 23 e 24 ilustram como foram analisados os perfis eletroforéticos.

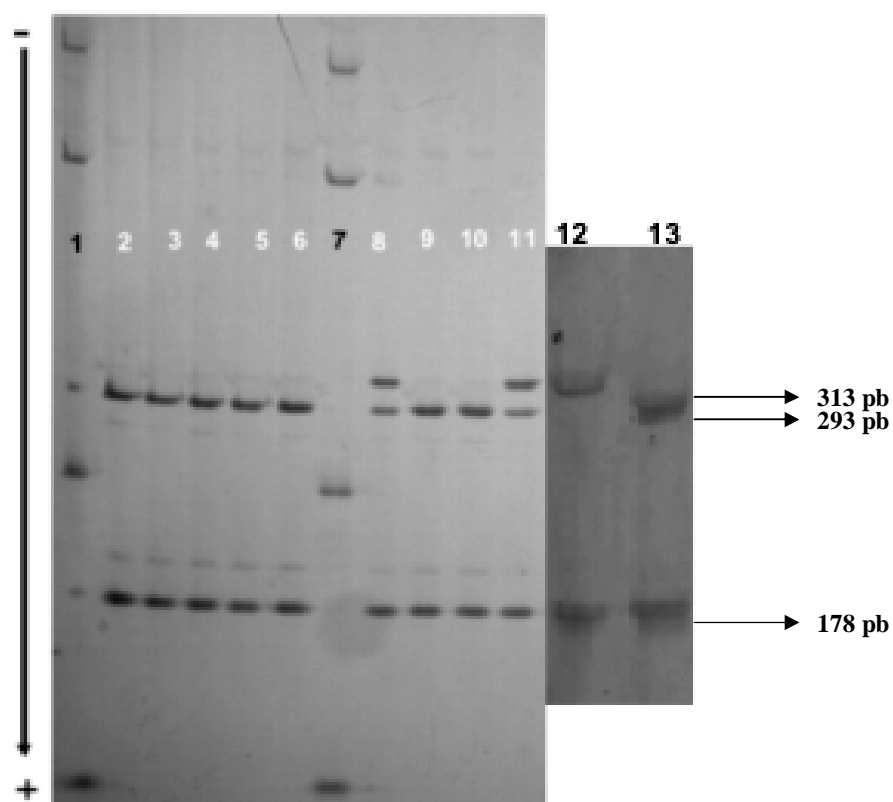


Figura 20. Análise do polimorfismo *XRCC1 194* através de digestão pela endonuclease de restrição *MspI* e visualização em gel de poliacrilamida 10%. Colunas: 1 e 7- padrão de peso molecular - 615pb, 491pb, 236 pb e 107pb; 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 e 13- indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo selvagem (CC) apresentando bandas com 293pb, 178pb e 20 pb (a última não visível); 8 e 11- indivíduos com o genótipo heterozigoto (CT), apresentando bandas com 313pb, 293pb, 178pb e 20 pb (a última não visível); 12- indivíduo com o genótipo homozigoto para o alelo variante (TT), apresentando bandas com 313pb, 178pb e 20 pb (a última não visível).



Figura 21. Análise do polimorfismo *XRCC1 Arg399Gln* através de digestão pela endonuclease de restrição *MspI* e visualização em gel de agarose 2%. 1- padrão de molecular de 100pb; 3, 5 e 7- indivíduos com o genótipo heterozigoto (GA) apresentando bandas com 615pb, 374pb e 221pb; 2, 4 e 6- indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo selvagem (GG), apresentando bandas com 374pb e 221pb; 8- indivíduo com o genótipo homozigoto para o alelo variante (AA), apresentando banda com 615pb.

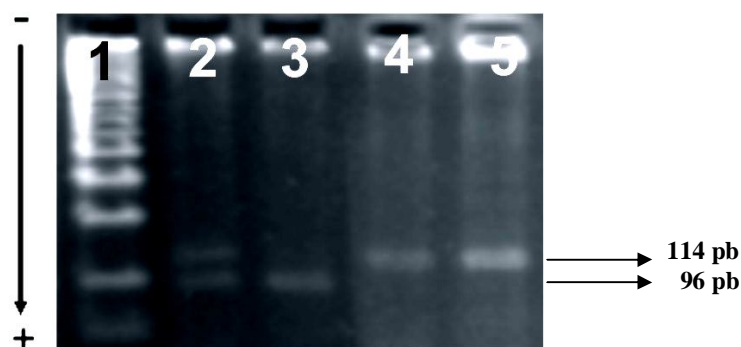


Figura 22. Análise do polimorfismo *COMT Val158Met* através de digestão pela endonuclease de restrição *NlaIII* e visualização em gel de agarose 5%. 1- padrão de peso molecular de 50pb; 2- indivíduo com o genótipo heterozigoto (GA), apresentando bandas com 114pb, 96pb, 54pb, 41pb, 27pb e 18pb (as quatro últimas não visíveis); 3- indivíduo com o genótipo homozigoto para o alelo variante, apresentando bandas com 96pb, 54pb, 41pb, 27pb e 18pb (as quatro últimas não visíveis); 4 e 5- indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo selvagem, apresentando bandas com 114pb, 54pb, 41pb e 27pb (as três últimas não visíveis).

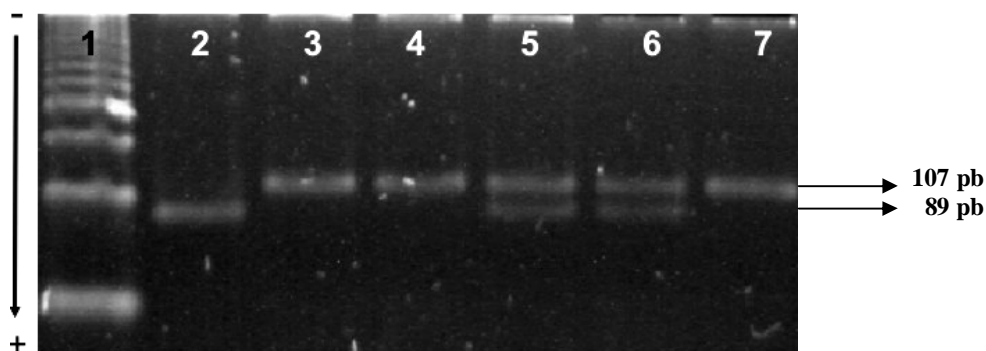


Figura 23. Análise do polimorfismo *MnSOD Val158Met* através de digestão pela endonuclease de restrição *NgoMIV* e visualização em gel de agarose 5%. 1- padrão de peso molecular de 50pb; 2- indivíduo com o genótipo homozigoto para o alelo variante (TT), apresentando bandas com 89pb e 18pb (a última não visível); 3,4 e 7- indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo selvagem (CC), apresentando bandas com 107pb e 18pb (a última não visível); 5 e 6- indivíduos com o genótipo heterozigoto (CT), apresentando bandas com 107pb, 89pb e 18pb (a última não visível).

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram submetidas ao teste χ^2 para verificar se estas se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). As frequências alélicas e genótípicas, bem como o EHW foram calculados utilizando-se o software GenePop disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>.

Baseado em tabelas de contingência 2x2 foi verificada a associação de determinados alelos, genótipos e dados clínicos e epidemiológicos com a susceptibilidade ao câncer de mama através do teste *odds ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p=0,05$ como o limite de significância. A OR foi calculada segundo a fórmula $OR=(ad)/(bc)$ (WOOLF, 1955), sendo que a, d, b e c estão de acordo com a Figura 21. Para o cálculo da OR foi utilizado o software EpiMax Table Calculator disponível em <http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>.

		Caso	Controle
Exposição ao fator de risco	+	a	b
	-	c	d

Figura 24. Tabela de contingência 2x2 ilustrativa para o cálculo de *odds ratio* – OR. Modificado de: RUMEL, 1986.

A *odds ratio* é um teste muito indicado para estudos tipo caso-controle (Figura 24), pois é uma forma de comparar se a probabilidade da ocorrência de certa característica (por ex. um determinado genótipo) é a mesma para dois grupos distintos (por ex. pacientes e indivíduos saudáveis). OR igual a um ($OR=1$), indica que a característica se distribui de forma igual nos dois grupos e assim, não pode estar associada a um deles. OR maior que um ($OR>1$),

indica que essa característica pode estar ligada ao primeiro grupo (nesse exemplo, o determinado genótipo pode estar ligado às pacientes – e conseqüentemente à susceptibilidade a doença). OR menor que um ($OR < 1$) indica que a característica pode não estar ligada ao primeiro grupo (nesse exemplo, o determinado genótipo pode não estar ligado às pacientes – e conseqüentemente pode estar agindo como fator protetor contra a doença).

Foi realizada análise de regressão logística univariada para obter-se OR (IC 95%) de genótipos dos SNPs estudados e de dados clínicos e epidemiológicos, bem como OR de interações entre os mesmos. Além da OR, também foram analisados os valores do teste de Wald com $p=0,05$ como limite de significância. O teste de Wald é usado em regressão logística para identificar o quanto a variável independente participa individualmente da variável dependente.

Através de regressão logística multivariada foi proposto um modelo final de interação entre os dados genéticos, epidemiológicos e clínicos estudados que melhor explicasse a doença. O método de escolha para a análise de regressão logística multivariada foi o método Backward Stepwise (Wald), o qual se baseia em um algoritmo misto de eliminação de covariáveis, segundo a importância das mesmas; essa importância é avaliada de acordo com o nível de significância do teste de Wald entre os modelos, buscando-se o maior coeficiente de Wald, assim, quanto mais significativo fosse o teste, mais importante seria considerada a covariável, sendo que aquelas covariáveis com baixa significância seriam excluídas do modelo. O teste Nagelkerke R^2 é uma medida de adequação de ajuste e demonstra o ajuste geral do modelo proposto; esse teste compara as probabilidades estimadas com as probabilidades observadas, sendo que os valores mais altos significam um melhor ajuste do modelo (HAIR, 2005). O teste de Hosmer & Lemeshow foi utilizado como medida final de ajuste do modelo; esse teste mede a correspondência entre valores reais e os previstos

da variável dependente, sendo que um bom ajuste é indicado por um valor de qui-quadrado não significativo ($p > 0,05$) (HAIR, 2005; HOSMER; LEMESHOW, 1989).

A variável dependente foi representada pelo câncer de mama, sendo adotado 1 para a ausência da doença (grupo controle) e 2 para a presença da doença (grupo de pacientes). As variáveis independentes foram representadas pelos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala*, e pelos dados clínicos e epidemiológicos. As ORs calculadas preliminarmente foram utilizadas como base para transformação de dados relacionados aos polimorfismos; foi adotado o valor 1 ao genótipo que apresentou a maior OR calculada e o valor 0 para os demais genótipos.

Para cada dado clínico e epidemiológico também se adotou uma classificação binária, sendo que para a presença do risco foi adotado o valor 1 e para a ausência do risco o valor 0. A categorização dos fatores de risco foi realizada com base na literatura. Os dados clínicos e epidemiológicos provenientes dos questionários respondidos por casos e controles selecionados para análise foram:

- idade da menarca: idade que ocorreu a primeira menstruação, sendo considerado como fator de risco para câncer de mama mulheres que tiveram a menarca antes dos 12 anos de idade;
- idade da menopausa: idade de início da menopausa, sendo considerado como fator de risco para a doença mulheres que iniciaram a menopausa aos 55 anos de idade ou mais;
- nuliparidade: mulheres que não tiveram filhos foram colocadas no grupo de risco para câncer de mama;
- amamentação: mulheres que nunca amamentaram foram adicionadas ao grupo de risco para a doença;

- idade da primeira gestação: mulheres que tiveram o primeiro filho com 30 anos ou mais foram consideradas sob risco de câncer de mama;

- utilização de anticoncepcional: mulheres que utilizavam ou já haviam utilizado anticoncepcional em algum momento foram adicionadas no grupo de risco para a doença;

- utilização de terapia de reposição hormonal: mulheres que faziam ou já haviam feito terapia de reposição hormonal em algum momento foram adicionadas ao grupo de risco para a doença;

- valor do índice de massa corpórea: mulheres com IMC igual ou superior a 25 foram consideradas sob risco de câncer de mama (valor estipulado seguindo recomendação da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia). A fórmula para o cálculo do IMC é dada por peso (em kg) dividido pela altura (em metros) ao quadrado $[\text{peso} / (\text{altura})^2]$;

- tabagista: tabagismo ativo, sendo considerado como fator de risco para câncer de mama mulheres que praticavam o tabagismo ativo;

- ex-tabagista: histórico positivo para tabagismo ativo, sendo considerado como fator de risco para a doença mulheres que em algum momento já tinham sido tabagistas ativas (e que no presente não eram mais tabagistas).

Os dados clínicos e epidemiológicos analisados, bem como a classificação binária adotada estão listados resumidamente na Tabela 8.

Para as análises de regressão logística foi utilizado o software SPSS® versão 12.0.

Tabela 8. Categorização e classificação binária das características clínicas e epidemiológicas estudadas.

<i>Característica</i>	<i>Categorização e Classificação Binária</i>	
	1	0
Idade da Menarca	<12 anos	≥12 anos
Idade da Menopausa	≥55 anos	<55 anos
Nuliparidade	Presente	Ausente
Amamentação	Ausente	Presente
Idade da primeira gestação	≥30 anos	<30 anos
Utilização de anticoncepcional	Presente	Ausente
Utilização de terapia de reposição hormonal	Presente	Ausente
Valor do índice de massa corpórea	≥25	<25
Tabagista	Sim	Não
Ex-tabagista	Sim	Não

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POPULACIONAL

A média da idade no grupo de casos foi de 53,60 anos ($\pm 16,64$) e do grupo de controles foi de 50,99 ($\pm 12,61$). O número de indivíduos classificados por origem geográfica e o número de indivíduos separados por grau de escolaridade em casos e controles encontram-se na Figuras 25 e 26, respectivamente. Observa-se uma disparidade acentuada entre casos e controles quanto à classificação pelo grau de escolaridade na categoria “Ensino fundamental incompleto”. Essa disparidade pode ser explicada por dois fatores: a) alguns dos indivíduos controles são provenientes de centros de estudo (como o NETI), nos quais os freqüentadores apresentam grau de escolaridade relativamente alto; b) todos os casos são provenientes de hospitais públicos sendo que a maioria foi atendida pelo sistema SUS, que possui como freqüentadores indivíduos com perfil sócio-econômico inferior e que conhecidamente é acompanhado pelo menor grau de escolaridade.

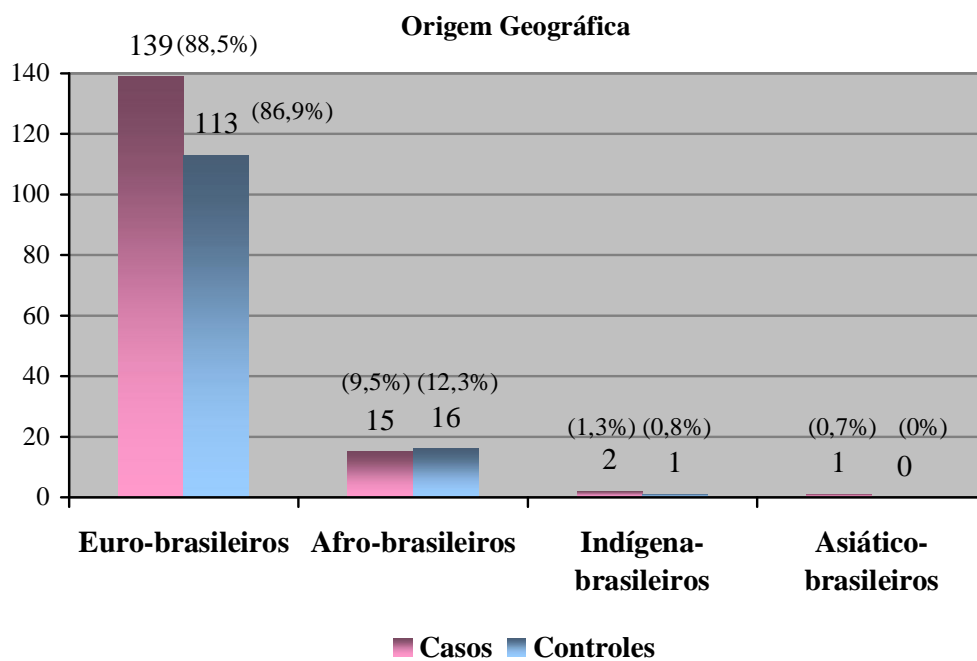


Figura 25. Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação a origem geográfica.

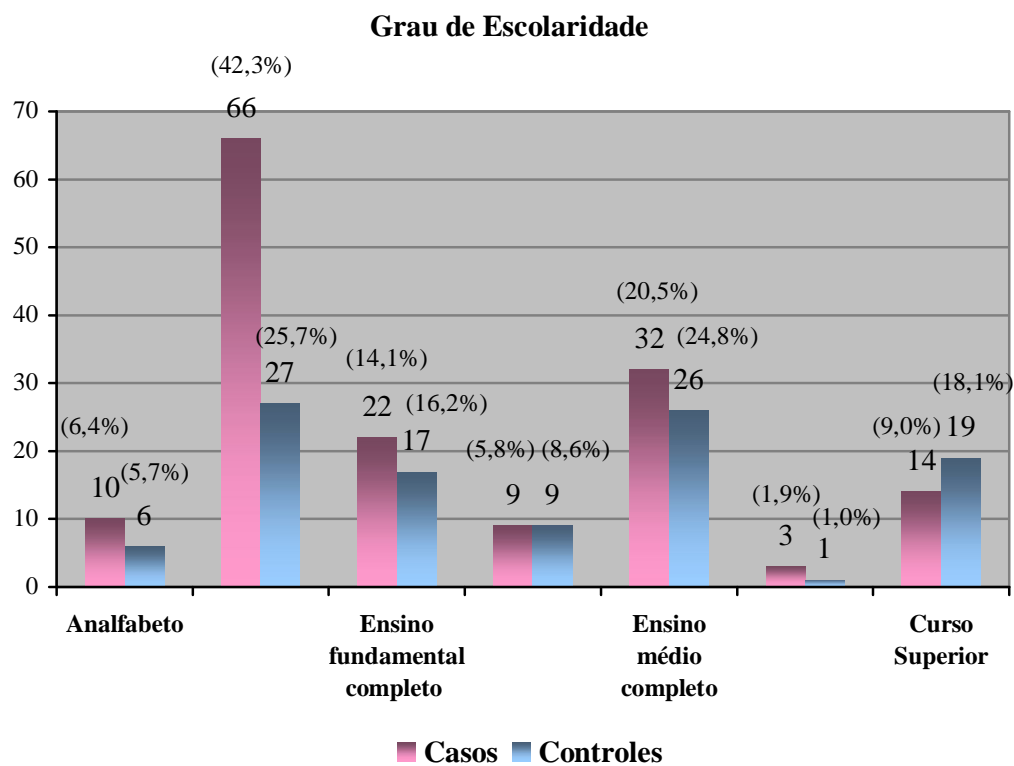


Figura 26. Classificação dos casos e controles em relação ao grau de escolaridade

6.2. ANÁLISES DOS SNPs DOS GENES *XRCC1*, *COMT* E *MnSOD*

6.2.1. SNP *XRCC1 Arg194Trp*

As frequências alélicas e genotípicas observadas para o SNP *XRCC1 Arg194Trp* em casos e controles analisados estão descritas na Tabela 9. As frequências genotípicas tanto em casos como em controles estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9).

Foi realizado cálculo de *odds ratio* (OR) considerando como fator de risco nos diferentes ensaios: o alelo T, tendo como referência o alelo C; o genótipo CT, tendo como referência o genótipo CC; o genótipo TT, tendo como referência o genótipo CC; a combinação dos genótipos CT e TT, tendo como referência o genótipo CC. Porém, devido à baixa frequência do alelo T, não foi possível realizar cálculo de OR para o genótipo TT. Através da OR não foi observada associação estatisticamente significativa entre o alelo T, o genótipo CT, a combinação de CT e TT (Tabela 9) com o câncer de mama.

Tabela 9. Frequências alélicas, genotípicas, *odds ratio* (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP *XRCC1 Arg194Trp*.

Alelo/Genótipo	Frequência (%)		OR	IC 95%	<i>p</i> ^a
	Casos	Controles			
C	0,921	0,911	1,0 (Ref)	-	-
T	0,079	0,089	0,925	0,459-1,864	0,946
CC	112 (84,2)	103 (83,1)	1,0 (Ref)	-	-
CT	21 (15,8)	20 (16,1)	0,988	0,471-1,983	1,000
TT	0 (0)	1 (0,8)	ND	ND	ND
(CT + TT) x CC	-	-	0,937	0,452-1,973	0,937
n^b	133	124			
EHW^c	1,000	1,000			

^a Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

^b Número total de indivíduos analisados

^c Valor de p para o EHW. Valores de $p > 0,05$ indicam aderência ao EHW

6.2.2. SNP *XRCC1 Arg399Gln*

Na Tabela 10 encontram-se distribuídas as frequências alélicas e genotípicas para o SNP *XRCC1 Arg399Gln* em casos e controles analisados, bem como a probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg a qual demonstra que as frequências genotípicas tanto em casos como em controles estão de acordo com o teorema.

As *odds ratio* (OR) calculadas não mostraram associação estatisticamente significativa entre o alelo A e os genótipos GA e AA separadamente ou em combinação com o câncer de mama (Tabela 10), considerando o alelo G e o genótipo GG como referências.

Tabela 10. Frequências alélicas, genotípicas, *odds ratio* (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP *XRCC1 Arg399Gln*.

Alelo/Genótipo	Frequência (%)		OR	IC 95%	<i>p</i> ^a
	Casos	Controles			
G	0,622	0,671	1,0 (Ref)	-	-
A	0,378	0,328	1,154	0,766-1,741	0,536
GG	60 (39,5)	61 (44,5)	1,0 (Ref)	-	-
GA	69 (45,4)	62 (45,3)	1,131	0,669-1,913	0,716
AA	23 (15,1)	14 (10,2)	1,670	0,739-3,803	0,250
(GA + AA) x GG	-	-	1,231	0,750-2,021	0,453
n^b	152	137			
EHW^c	0,729	0,847			

ND: não determinado

^a Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

^b Número total de indivíduos analisados

^c Valor de p para o EHW. Valores de $p > 0,05$ indicam aderência ao EHW

6.2.3. SNP *COMT Val158Met*

Para o SNP *COMT Val158Met*, as frequências genóticas tanto em casos como em controles analisados estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém pode-se observar um pequeno aumento da frequência do genótipo AA no grupo de casos, que causou uma diminuição acentuada do valor da probabilidade, mas que ainda é significativa para o EHW. As frequências alélicas, genóticas e o EHW para esse SNP estão descritos na Tabela 11.

De acordo com as *odds ratio* (OR) calculadas, não há associação estatisticamente significativa do alelo variante (A) e dos genótipos contendo o alelo variante (GA e AA), individualmente analisados ou em combinação com o câncer de mama, tendo como referência o alelo selvagem (G) e o genótipo homozigoto selvagem (GG).

Tabela 11. Frequências alélicas, genóticas, *odds ratio* (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP *COMT Val158Met*.

Alelo/Genótipo	Frequência (%)		OR	IC 95%	<i>p</i> ^a
	Casos	Controles			
G	0,479	0,537	1,0 (Ref)	-	-
A	0,521	0,463	1,172	0,779-1,763	0,485
GG	39 (26,9)	40 (29,6)	1,0 (Ref)	-	-
GA	61 (42,1)	65 (48,1)	1,963	0,527-1,757	1,000
AA	45 (31,0)	30 (22,2)	1,538	0,773-3,067	0,245
(GA + AA) x GG	-	-	1,144	0,658-1,991	0,707
n^b	145	135			
EHW^c	0,063	0,733			

^a Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

^b Número total de indivíduos analisados

^c Valor de p para o EHW. Valores de $p > 0,05$ indicam aderência ao EHW

6.2.4. SNP *MnSOD Val-9Ala*

A análise das frequências genotípicas do SNP *MnSOD Val-9Ala* para o equilíbrio de Hardy-Weinberg demonstrou que o grupo de casos não está de acordo com teorema, havendo excesso de heterozigotos, diferentemente do grupo de controles, o qual se encontra em EHW. Como há um percentual das genotipagens que sempre são repetidas e o fato de o protocolo para genotipagem desse SNP ser claro e de fácil interpretação, descartou-se a possibilidade de erro técnico. O fato do grupo de controles apresentar aderência ao EHW também reforça a teoria de que não houve erro técnico, uma vez que as amostras de casos e controles não são genotipadas separadamente. As frequências alélicas, genotípicas e o EHW para casos e controles podem ser visualizados na Tabela 12. Através do cálculo de *odds ratio* (OR) não foi observada associação estatisticamente significativa entre o SNP *MnSOD Val-9Ala* e o câncer de mama. Para as ORs calculadas foi considerado como fator de risco: o alelo C, tendo como referência o alelo T; o genótipo TC, tendo como referência o genótipo TT; o genótipo CC, tendo como referência o genótipo TT; a combinação dos genótipos TC e CC, tendo como referência o genótipo TT (Tabela 12).

Tabela 12. Frequências alélicas, genotípicas, *odds ratio* (OR) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para o SNP *MnSOD Val-9Ala*.

Alelo/Genótipo	Frequência (%)		OR	IC 95%	<i>p</i> ^a
	Casos	Controles			
T	0,526	0,549	1,0 (Ref)	-	-
C	0,474	0,451	1,812	0,727-1,155	0,812
TT	36 (23,2)	39 (27,3)	1,0 (Ref)	-	-
TC	91 (58,7)	79 (55,2)	1,248	0,699-2,230	0,509
CC	28 (18,1)	25 (17,5)	1,213	0,565-2,609	0,719
(TC + CC) x TT	-	-	1,240	0,710-2,164	0,502
n^b	155	143			
EHW^c	0,041	0,229			

^a Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

^b Número total de indivíduos analisados

^c Valor de p para o EHW. Valores de $p > 0,05$ indicam aderência ao EHW

6.3. ANÁLISE DOS SNPs POR REGRESSÃO LOGÍSTICA

De acordo com os valores de *odds ratio* (OR) calculados anteriormente para todos os genótipos de cada SNP estudado, foi criada uma classificação binária (Tabela 13), onde o genótipo com a maior OR calculada foi considerado como fator de risco para câncer de mama (1) e os demais genótipos foram considerados como nulos (0).

Tabela 13. Categorização e classificação binária dos genótipos dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* conforme *odds ratio* (OR) calculados preliminarmente.

SNP	Categorização e Classificação Binária	
	1	0
<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	CT	CC e TT
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	AA	GG e GA
<i>COMT Val158Met</i>	AA	GG e GA
<i>MnSOD Val-9Ala</i>	TC	TT e CC

Na Tabela 14 estão apresentados os valores de OR, teste de Wald e *p* calculados por regressão logística para os SNPs estudados de acordo com a classificação binária estabelecida. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre os SNPs individualmente e o câncer de mama.

Além da análise de cada SNP isoladamente, foram analisadas por regressão logística, combinações de dois SNPs que podem ser visualizadas na Tabela 14; a combinação dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp* e *XRCC1 Arg399Gln* (combinação de genótipos CT e AA respectivamente) não pode ser visualizada devido ao número insuficiente de indivíduos, impossibilitando a análise estatística. A combinação dos SNPs *XRCC1 Arg399Gln* e *COMT Val158Met* mostrou OR de 3,909, Wald de 4,302 e *p* de 0,038, que indica associação estatisticamente significativa das combinação dos genótipos AA de ambos os SNPs com o câncer de mama, ou seja, mulheres com essa combinação de genótipo teriam risco de

desenvolver a doença aumentado em quase quatro vezes. Outra combinação de SNPs que também mostrou associação significativa com o câncer de mama foi *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala*, cuja combinação de genótipos AA e TC respectivamente, resultou em OR de 2,129, Wald de 4,375 e *p* de 0,036 mostrando que mulheres com essa combinação de genótipo para esses SNPs poderiam ter aproximadamente duas vezes mais chances de desenvolver câncer de mama.

Tabela 14. Análise dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* de forma individual e combinada por regressão logística.

SNPs	OR	IC (95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^a
<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	0,975	0,500-1,902	0,006	0,941
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	1,579	0,777-3,208	1,593	0,207
<i>COMT Val158Met</i>	1,643	0,958-2,818	3,254	0,071
<i>MnSOD Val-9Ala</i>	1,132	0,715-1,792	0,280	0,597
<i>XRCC1 Arg194Trp</i> + <i>XRCC1 Arg399Gln</i>	ND	ND	ND	ND
<i>XRCC1 Arg194Trp</i> + <i>COMT Val158Met</i>	0,766	0,228-2,579	0,185	0,667
<i>XRCC1 Arg194Trp</i> + <i>MnSOD Val-9Ala</i>	0,714	0,311-1,639	0,630	0,427
<i>XRCC1 Arg399Gln</i> + <i>COMT Val158Met</i>	3,909	1,078-14,176	4,302	0,038
<i>XRCC1 Arg399Gln</i> + <i>MnSOD Val-9Ala</i>	1,556	0,658-3,682	1,014	0,314
<i>COMT Val158Met</i> + <i>MnSOD Val-9Ala</i>	2,129	1,049-4,323	4,375	0,036

ND: não determinado

^a Probabilidade. Valores de *p*<0,05 foram considerados significativos

Não foi possível realizar análise de três SNPs combinados devido ao baixo número de indivíduos existentes para essas combinações.

6.4. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Todos os dados clínicos e epidemiológicos, exceto “utilização de terapia de reposição hormonal”, foram coletados através dos questionários de forma satisfatória, permitindo as análises estatísticas pertinentes. A característica “utilização de terapia de reposição hormonal” foi retirada das análises estatísticas, pois não houve dados suficientes no grupo controle, tanto por falta de preenchimento como por preenchimento incorreto dessa característica para esse grupo, impossibilitando sua comparação ao grupo de casos.

Na Tabela 15 estão descritas as frequências das características selecionadas para análise tanto em casos como em controles, já subdivididas nas categorias de risco listadas na Tabela 8 e discutidas acima (o número 1 sempre representa o grupo de risco para câncer de mama). Ainda na Tabela 14 é possível visualizar e comparar os cálculos de *odds ratio* (OR) pelo método convencional e por regressão logística, além do teste de Wald (fornecido pela análise de regressão logística) que pode predizer o quanto da característica em questão (variável independente) está associada à população estudada (variável dependente). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre as características escolhidas e o câncer de mama. Porém, o fator “Tabagista” mostrou valor de OR interessante (OR de 2,105; IC95% 0,998-4,438; Wald de 3,383) que se aproxima do nível de significância pelo teste de Wald (p de 0,051). Esse valor sugere que poderia haver associação do hábito de fumar com o câncer de mama.

Tabela 15. Categorização, frequência e *odds ratio* (OR) das características (dados clínicos e epidemiológicos coletados através de questionário) selecionadas para análise.

Característica	Categorização	Frequência		OR ^a (IC 95%)	p ^b	OR ^c (IC 95%)	Teste de Wald	p ^b
		Casos	Controles					
Idade da Menarca	<12 anos (1)	26	18	1,218	0,667	1,209	0,327	0,568
	≥12 anos (2)	134	113	(0,607-2,456)		(0,631-2,318)		
Idade da Menopausa	≥55 anos (1)	4	8	0,320	0,108	0,320	3,309	0,069
	<55 anos (2)	153	98	(0,079-1,213)		(0,940-1,092)		
Nuliparidade	Presente (1)	20	14	1,133	0,880	1,133	0,113	0,737
	Ausente (2)	140	111	(0,518-2,491)		(0,547-2,343)		
Amamentação	Ausente (1)	37	21	1,443	0,294	1,458	1,518	0,218
	Presente (2)	116	95	(0,761-2,749)		(0,800-2,657)		
Idade da primeira gestação	≥30 anos (1)	17	16	0,871	0,853	0,871	0,138	0,710
	<30 anos (2)	139	114	(0,518-2,491)		(0,422-1,801)		
Utilização de anticoncepcional	Presente (1)	111	87	0,612	0,114	0,612	2,926	0,087
	Ausente (2)	50	24	(0,336-1,113)		(0,349-1,074)		
Utilização de terapia de reposição hormonal	Presente (1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ausente (2)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Valor do índice de massa corpórea	≥25 (1)	90	76	0,987	1,000	0,972	0,014	0,906
	<25 (2)	66	55	(0,600-1,624)		(0,608-1,555)		
Tabagista	Sim (1)	26	11	2,105	0,070	2,105	3,383	0,051
	Não (2)	137	122	(0,948-4,753)		(0,998-4,438)		
Ex-tabagista	Sim (1)	40	26	1,251	0,520	1,251	0,614	0,433
	Não (2)	123	100	(0,689-2,275)		(0,715-2,189)		

ND: não determinado

^a OR calculado através do software EpiMax^b Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos^c OR calculado por regressão logística através do software SPSS® 12.0.

6.5. ANÁLISE DAS COMBINAÇÕES ENTRE SNPs E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS POR REGRESSÃO LOGÍSTICA

Na Tabela 16 encontra-se descrita a análise de cada SNP combinado com cada dado epidemiológico e clínico por regressão logística, mostrando o valor de *odds ratio* (OR), teste de Wald e valor de *p*. Algumas análises não puderam ser realizadas devido ao baixo número de indivíduos que combinassem determinado SNP e determinada característica escolhida; não foi possível analisar o SNP *XRCCI Arg194Trp* com nenhuma característica devido a esse mesmo motivo.

O SNP *COMT Val158Met* combinado com a característica “amamentação” e o SNP *MnSOD Val-9Ala* combinado com a característica “ex-tabagista” mostraram valores interessantes de OR (4,583 e 2,437 respectivamente) que se aproximaram do nível de significância pelo teste de Wald ($p=0,051$ para ambos). Isso sugere a possibilidade de haver associação da combinação do genótipo de risco de *COMT Val158Met* e o fato de mulheres não amamentarem, bem como do genótipo de risco de *MnSOD Val-9Ala* com a característica de já ter sido tabagista, com o câncer de mama, porém, não chegando a apresentar associação significativa com a mesma. No entanto nenhuma dessas combinações apresentou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama.

As demais combinações de SNPs com dados epidemiológicos e clínicos não mostraram associação estatisticamente significativa com o câncer de mama.

Realizou-se também análise por regressão logística de combinações de dois SNPs com cada dado epidemiológico e clínico (dados não mostrados). Não se obteve sucesso em muitas destas análises devido ao baixo número de indivíduos por combinação, e nas combinações que puderam ser analisadas, não foi observado associação estatisticamente significativa com o câncer de mama.

Tabela 16. Análise dos SNPs *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* combinados com as características clínicas e epidemiológicas selecionadas por regressão logística.

Característica \ SNP	<i>XRCC1 Arg399Gln</i>			<i>COMT Val158Met</i>			<i>MnSOD Val-9Ala</i>		
	OR (IC95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^a	OR (IC95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^a	OR (IC95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^a
Idade da Menarca	1,664 (0,408-6,797)	0,504	0,478	1,698 (0,416-6,937)	0,543	0,461	1,427 (0,603-3,378)	0,653	0,419
Idade da Menopausa	ND	ND	ND	0,674 (0,420-10,904)	0,077	0,781	0,263 (0,050-1,383)	2,487	0,115
Nuliparidade	0,514 (0,084-3,125)	0,523	0,469	4,964 (0,589-41,829)	2,171	0,141	1,265 (0,528-3,029)	0,277	0,598
Amamentação	1,144 (0,188-6,968)	0,021	0,884	4,583 (0,994-21,140)	3,810	0,051	2,029 (0,956-4,306)	3,395	0,065
Idade da primeira gestação	ND	ND	ND	0,630 (0,138-2,874)	0,355	0,551	1,045 (0,419-2,608)	0,009	0,925
Utilização de anticoncepcional	1,349 (0,577-3,156)	0,477	0,490	0,910 (0,471-1,759)	0,079	0,779	0,761 (0,463-1,251)	1,160	0,281
Valor do índice de massa corpórea	1,339 (0,503-3,566)	0,340	0,560	1,437 (0,716-2,884)	1,042	0,307	1,184 (0,710-1,970)	0,424	0,515
Tabagista	4,212 (0,486-36,540)	1,702	0,192	1,712 (0,503-5,828)	0,740	0,390	1,430 (0,604-3,384)	0,663	0,415
Ex-tabagista	2,795 (0,570-13,713)	1,604	0,205	0,971 (0,388-2,427)	0,004	0,949	2,437 (0,995-5,968)	3,799	0,051

ND: não determinado

^a Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

6.6. ANÁLISE DE MODELOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS DE INTERESSE POR REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA

Nessa última etapa da análise estatística, buscou-se encontrar um modelo de interação entre os polimorfismos tipo SNP e os dados epidemiológicos e clínicos estudados que melhor pudesse explicar o câncer de mama.

Modelo 1: Primeiramente foi analisada a interação dos quatro SNPs, *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala*, para que se pudesse criar uma estimativa de como as variáveis genéticas influenciavam na doença. Para isso os quatro SNPs, obedecendo a mesma classificação binária já relatada, foram inseridos em um modelo de regressão logística multivariada utilizando o método Backward Stepwise (Wald), no qual a cada passo, a variável com menor valor de Wald é retirada, buscando-se o melhor ajuste do modelo proposto inicialmente. O resultado dessa análise pode ser visualizado na Tabela 17, onde estão descritos os valores de *odds ratio* (OR), teste de Wald e valor de *p* para cada SNP dentro da interação prevista pelo modelo, além das medidas Nagelkerke R^2 e Hosmer & Lemeshow que demonstram como o modelo se ajusta à doença.

Tabela 17. Análise dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.

Variáveis (passo 1 ^a)	OR (IC95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^b
<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	0,960 (0,475-1,940)	0,013	0,909
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	1,539 (0,683-3,464)	1,082	0,298
<i>COMT Val158Met</i>	1,288 (0,725-2,290)	0,744	0,388
<i>MnSOD Val-9Ala</i>	1,055 (0,633-1,757)	0,042	0,838
Nagelkerke R^2			
0,012 (1,2%)			
Hosmer & Lemeshow			
$\chi^2 = 1,314$ <i>p</i> = 0,933			

^a o modelo mostrou o melhor ajuste no passo 1, onde todos os SNPs analisados faziam parte do modelo

^b Probabilidade. Valores de *p* < 0,05 foram considerados significativos

Através da análise do teste de Hosmer and Lemeshow, o modelo que melhor se ajustou à doença foi aquele que apresentava os quatro SNPs na interação (esse modelo obteve valor de p de 0,933 para o χ^2 , que foi o mais significativo - os dados do teste para os modelos restantes criados a partir do modelo inicial não são mostrados). De acordo com o teste de Nagelkerke R^2 esse modelo pode explicar somente 1,2% dos eventos relacionados à doença. Nenhuma das variáveis apresentadas mostra associação estatisticamente significativa com o câncer de mama dentro deste modelo de interação.

Modelo 2: nesse segundo modelo proposto, foram inseridas como variáveis os quatro SNPs e também os dados epidemiológicos e clínicos já discutidos anteriormente, de acordo com a mesma classificação binária já apresentada. Foi utilizada a mesma metodologia de análise e o resultado encontra-se na Tabela 18 que apresenta os valores de *odds ratio* (OR), teste de Wald e valor de p para cada variável dentro da interação prevista pelo modelo e os testes Nagelkerke R^2 e Hosmer & Lemeshow.

O modelo que melhor se ajustou à doença levando em consideração a interação das variáveis apresentadas no modelo inicial foi aquele onde estavam presentes as variáveis *MnSOD Val-9Ala*, idade da menarca, idade da menopausa, nuliparidade, amamentação, idade da primeira gestação, utilização de anticoncepcional e ex-tabagista (Hosmer & Lemeshow, p de 0,999 - os dados do teste para os modelos restantes criados a partir do modelo inicial não são mostrados). Esse modelo explica 8,6% dos eventos relacionados à doença, de acordo com o teste de Nagelkerke R^2 . Porém, somente para a variável “idade da menarca” foi obtido resultado estatisticamente significativo (OR de 3,003; Wald de 4,226 e p de 0,040) dentro deste modelo de interação.

Tabela 18. Análise dos SNPs *XRCCI Arg194Trp*, *XRCCI Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* e das características clínicas e epidemiológicas por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.

Variáveis (passo 5 ^a)	OR (IC95%)	Teste de Wald	p ^b
<i>MnSOD Val-9Ala</i>	1,081 (0,557-2,752)	0,056	0,813
Idade da menarca	3,003 (0,541-3,489)	4,226	0,040
Idade da menopausa	0,489 (1,162-8,034)	0,556	0,456
Nuliparidade	1,277 (0,912-5,935)	0,117	0,733
Amamentação	1,407 (0,912-5,935)	0,417	0,518
Idade da primeira gestação	0,628 (0,912-5,935)	0,865	0,628
Utilização de anticoncepcional	0,604 (0,912-5,935)	1,669	0,117
Tabagista	1,895 (0,939-5,258)	1,812	0,178
Ex-tabagista	1,292 (0,684-2,637)	0,451	0,502
Nagelkerke R²			
0,086 (8,6%)			
Hosmer & Lemeshow			
$\chi^2 = 0,929$ $p = 0,999$			

^a o modelo mostrou o melhor ajuste no passo 5, onde as variáveis *XRCCI Arg194Trp*, *XRCCI Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e valor do índice de massa corpórea foram removidas do modelo

^b Probabilidade. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

Modelo 3: no terceiro e último modelo proposto, utilizando-se a mesma metodologia de análise, foram inseridas como variáveis os quatro SNPs e os dados clínicos e epidemiológicos que obtiveram os maiores valores de OR nas análises por regressão logística univariada (idade da menarca, nuliparidade, amamentação, tabagista e ex-tabagista), pois assim teríamos as variáveis epidemiológicas e clínicas que parecem mais significar para o risco da doença em um modelo de interação com as variáveis genéticas.

Os valores de *odds ratio* (OR), teste de Wald e valor de *p* para cada variável dentro da interação prevista pelo modelo e os testes Nagelkerke R^2 e Hosmer & Lemeshow, encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Análise dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* e das características clínicas e epidemiológicas que apresentaram os maiores valores de *odds ratio* (OR) por regressão logística multivariada mostrando o modelo que melhor se ajustou.

Variáveis (passo 4 ^a)	OR (IC95%)	Teste de Wald	<i>p</i> ^b
<i>XRCC1 Arg194Trp</i>	1,238 (0,557-2,752)	0,275	0,600
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	1,374 (0,541-3,489)	0,446	0,504
Idade da menarca	3,056 (1,162-8,034)	5,131	0,024
Nuliparidade	2,326 (0,912-5,935)	3,119	0,077
Tabagista	2,222 (0,939-5,258)	3,300	0,069
Ex-tabagista	1,343 (0,684-2,637)	0,735	0,391
Nagelkerke R^2 0,095 (9,5%)			
Hosmer & Lemeshow $\chi^2 = 1,375$ <i>p</i> = 0,927			

^a o modelo mostrou o melhor ajuste no passo 4, onde as variáveis *COMT Val158Met*, *MnSOD Val-9Ala* e amamentação foram removidas do modelo

^b Probabilidade. Valores de *p* < 0,05 foram considerados significativos

Partindo do modelo inicial, o modelo que melhor se ajustou à doença de acordo com a interação das variáveis propostas foi aquele onde estavam presentes as variáveis *XRCCI Arg194Trp*, *XRCCI Arg399Gln*, idade da menarca, nuliparidade, tabagista e ex-tabagista (Hosmer & Lemeshow, p de 0,927 - os dados do teste para os modelos restantes criados a partir do modelo inicial não são mostrados). Através da análise do teste de Nagelkerke R^2 , esse modelo pode explicar 9,5% dos eventos relacionados à doença. Novamente, somente para a variável “idade da menarca” foi obtido resultado estatisticamente significativo (OR de 3,056; Wald de 5,131 e p de 0,024) dentro da interação, porém nesse modelo as variáveis “nuliparidade” e “tabagista” também mostraram valores individuais de OR (2,326 e 2,222, respectivamente) e p interessantes (0,077 e 0,069, respectivamente), mostrando que esses fatores também podem ser decisivos para este modelo final de interação.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, o mais comum entre as mulheres e justificadamente o mais temido pelas mesmas. Nos últimos tempos está se tornando cada vez maior o esforço para realização de iniciativas que aumentem o conhecimento sobre este câncer. Através de campanhas publicitárias grandiosas que trazem valiosos esclarecimentos sobre a doença, da criação de grupos de apoio a pessoas afetadas pela doença e familiares, de grupos de conscientização e de campanhas de prevenção e monitoramento, a população como um todo passa a ser mais atenciosa com a própria saúde e disseminadora dos conhecimentos adquiridos. Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama; além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco (INCA, 2007).

A existência de uma predisposição dominante que conferisse alto risco de desenvolvimento de câncer de mama se confirmou após a descoberta de mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As mutações funcionais desses dois genes estão fortemente associadas a um aumento dramático do risco de câncer de mama, no entanto, essas mutações são raras, ocorrendo com maior freqüência em apenas alguns grupos de alto risco (ONAY *et al.*, 2006; MARCHAND *et al.* 2005). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são comuns e têm mostrado contribuir para o risco de câncer de mama em vários estudos publicados, apesar da contribuição de cada um deles ser relativamente pequena. ONAY *et al.* (2006) relatam que SNPs perfazem mais que 1% de toda a variabilidade do genoma humano na população em geral.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de desvendar o papel da genética na origem e desenvolvimento do câncer de mama, porém muito do que se sabe hoje (e que já está bem estabelecido) é em relação aqueles genes ditos de “alta penetrância” (como *BRCA1* e *BRCA2*) que são de grande importância para 5% a 10% do total de casos de câncer de mama. Assim, grande maioria dos casos de câncer de mama permanece obscura do que diz respeito à genética. Os estudos com genes de “baixa penetrância” aumentam tanto em número como em tamanho, na tentativa de se identificar e estabelecer como esses genes poderiam agir na etiologia da doença. Um grande número desses estudos vem sendo conduzidos na busca principalmente de genes candidatos que atuam nas vias metabólicas que são importantes para a doença.

A região Sul do Brasil apresenta a maior taxa de incidência de câncer de mama do país. Em Santa Catarina há poucos estudos publicados envolvendo a genética do câncer de mama. Sendo assim, esse trabalho procurou trazer uma contribuição do que diz respeito aos genes de baixa penetrância que participam de vias de reparo de DNA e detoxificação na etiologia da doença. Essas vias são reconhecidamente importantes para muitos tipos de cânceres humanos, incluindo o câncer de mama. Também foi conduzido estudo dos efeitos de fatores epidemiológicos e clínicos, já estabelecidos como sendo de grande importância para a etiologia da doença, bem como das interações desses fatores com os genes de baixa penetrância candidatos, baseado na população do estado de Santa Catarina.

7.1. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Os cálculos das ORs através do método convencional e por regressão logística se mostraram bastante semelhantes, sendo que os valores de p se aproximam mais do nível de significância quando o cálculo é realizado por regressão logística. Apesar da análise da característica “tabagismo” ter se mostrado interessante (OR de 2,105; IC95% 0,998-4,438;

Wald de 3,383; p de 0,051), não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre as características epidemiológicas e clínicas estudadas e o câncer de mama.

7.2. GENE *XRCC1*

Os sistemas de reparo de DNA apresentam papel importante no desenvolvimento de tumores malignos existindo fortes evidências de que falhas nesses sistemas de reparo de DNA tenham papel importante no desenvolvimento de câncer de mama (SANGRAJRANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006; THYAGARAJAN *et al.*, 2006). Sugere-se que o reparo por excisão de bases (BER) é o sistema de reparo mais determinante para o risco de câncer de mama, uma vez que repara lesões oxidativas do DNA. Essas lesões são induzidas principalmente por radicais livres produzidos, por exemplo, durante o metabolismo de estrógenos e pela exposição exógena a compostos químicos e radiação ionizante (SANGRAJRANG *et al.*, 2007). Uma das proteínas mais importantes para o BER é a XRCC1 que age como proteína suporte podendo regular tanto a duração como a força de interação entre as múltiplas proteínas participantes do BER (SANGRAJRANG *et al.*, 2007; LOIZIDOU *et al.*, 2007; PACHKOWSKI *et al.*, 2006; THYAGARAJAN *et al.*, 2006). SNPs presentes em proteínas dessa rota podem tornar o reparo de DNA insuficiente, resultando em aumento de danos (SANGRAJRANG *et al.*, 2007; CHACKO *et al.*, 2005).

7.2.1 SNP *Arg194Trp*

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados de alguns estudos da literatura de associação caso-controle realizados para o SNP *XRCC1 Arg194Trp* e o câncer de mama. A distribuição das frequências genótípicas de *Arg194Trp* na população estudada nesse trabalho encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg assim como em todas as populações dos estudos presentes na Tabela 20. Nesse SNP, a frequência do alelo variante observada foi de 0,079 e 0,089 em casos e controles respectivamente. Essas frequências se assemelham às

encontradas nas populações de portugueses, chiprianos, norte-americanos (tanto afro-descendentes como brancos) e turcos (SILVA *et al.*, 2007; LOIZIDOU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006; PACHKOWSKI *et al.*, 2006; THYAGARAJAN *et al.*, 2006; DELIGEZER; DALAY, 2004; DUELL *et al.*, 2001). Porém, essas frequências são inferiores às aquelas encontradas nas populações de tailandeses e indianos (SANGRAJRANG *et al.*, 2007; CHACKO *et al.*, 2005). Observa-se que as frequências em populações asiáticas de 194Trp parecem ser superiores às aquelas encontradas nas demais populações. As frequências alélicas encontradas no presente trabalho se assemelham às aquelas de populações europeias e isso se deve provavelmente à origem geográfica predominante dos ancestrais da população estudada (euro-descendente).

A OR calculada para a presença do alelo T para este SNP não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama no presente trabalho.

A OR calculada para o genótipo CT foi de 0,988 (IC95% 0,471-1,983) com *p* de 0,937, mostrando que não há associação desse genótipo com o câncer de mama para a população estudada. Esse dado é semelhante àqueles encontrados nos estudos apresentados na Tabela 20, exceto no estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005), que encontraram associação do genótipo CT com o câncer de mama (OR sem ajuste de 1,85; IC95% 1,01-3,38) estatisticamente significativa (*p*=0,04). Nesse mesmo estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005) também foi encontrada associação estatisticamente significativa com o câncer de mama quando a OR foi ajustada para a idade e fase da menopausa (OR de 1,89; IC 95% 0,99-3,62; *p* de 0,05).

Devido à baixa frequência do alelo T na população estudada não foi possível realizar o cálculo de associação do genótipo TT com o câncer de mama, assim como ocorrido no

estudo realizado por DELIGEZER e DALAY (2004), o qual apresentou número de indivíduos e frequência alélica semelhantes com aqueles da população aqui estudada.

A OR calculada para os genótipos CT e TT em combinação foi de 0,937 (IC95% 0,452-1,973) com p de 0,937, descartando a possibilidade de associação da combinação desses genótipos com o câncer de mama para a população estudada. Esse dado é semelhante àqueles encontrados nos estudos de SILVA *et al.* (2007), THYAGARAJAN *et al.* (2006) e DELIGEZER e DALAY (2004). Porém, o estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005) mostrou que há associação estatisticamente significativa dessa combinação de genótipos (CT e TT) com câncer de mama, tanto quando a OR foi calculada sem ajuste (OR de 1,98; IC95% 1,13-3,48; p de 0,017) como quando foi ajustada para a idade e fase da menopausa (OR de 2,04; IC 95% 1,23-3,72; p de 0,01).

Tabela 20. Estudos de associação caso-controlre realizados para o SNP *XRCC1* Arg194Trp e câncer de mama

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo T) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) CC/CT/TT	OR ₂ ^c (CI 95%) CC/CT/TT
SANGRAJRANG <i>et al.</i> , 2007	507 / 425 Tailandeses	Médias: 48,0 ±10,0/ 45,3 ±12,2	0,30 / 0,31	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				1,08 (0,82-1,41)	1,08 (0,81-1,44)
				0,75 (0,47-1,20)	0,70 (0,42-1,14)
SILVA <i>et al.</i> , 2007	241 / 457 Portugueses	NI	0,09 / 0,06	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				1,46 (0,94-2,27)	1,49 (0,95-2,32)
				2,00 (0,12-32,14)	1,66 (0,10-27,43)
LOIZIDOU <i>et al.</i> , 2007	1.109 / 1.177 Chiprianos	40-70 / 40-70 Média: 56,0 / 56,0	0,09 / 0,09	1,00 (Ref)	-
				1,02 (0,82-1,28)	
				0,95 (0,36-2,46)	
ZHANG <i>et al.</i> , 2006	1.580 / 1.253 Norte-americanos	20-74 / 20-74	0,06 / 0,07	1,00 (Ref)	-
				0,90 (0,80-1,20)	
				0,50 (0,20-1,40)	
PACHKOWSKI <i>et al.</i> , 2006	787 / 718	NI	0,07 / 0,07	1,00 (Ref)	-
	Norte-americanos			1,00 (0,70-1,30)	
	afro-descendentes			0,70 (0,10-4,40)	
	1.016 / 746			1,00 (Ref)	
	Norte-americanos			0,90 (0,70-1,20)	
	brancos			0,90 (0,30-2,80)	

Continuação da Tabela 20

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo T) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) CC/CT/TT	OR ₂ ^c (CI 95%) CC/CT/TT
THYAGARAJAN <i>et al.</i> , 2006	460 / 324 Norte-americanos	NI	0,07 / 0,06	1,00 (Ref) 1,20 (0,77-1,87) 1,02 (0,23-4,57)	1,00 (Ref) 1,23 (0,21-4,63) 0,98 (0,21-4,63)
CHACKO <i>et al.</i> , 2005	123 / 123 Indianos	NI	0,21 / 0,12	1,00 (Ref) 1,85 (1,01-3,38) ^d 2,73 (0,81-9,2)	1,00 (Ref) 1,89 (0,99-3,62) ^e 2,78 (0,82-9,40)
DELIGEZER; DALAY, 2004	151 / 133 Turcos	29-75/23-70 Médias: 51,5 ±11,2/ 41,0 ±11,3	0,04 / 0,05	1,00 (Ref) 0,41 (0,16-1,06) -	-
DUELL <i>et al.</i> , 2001	161 / 166 Norte-americanos afro-descendentes	Médias: 50,5 / 51,6	0,05 / 0,06	-	-
	251 / 234 Norte-americanos brancos		0,05 / 0,07	-	-

NI: não informado

^a OG: origem geográfica^b OR₁: OR não ajustado^c OR₂: OR ajustado para parâmetros epidemiológicos^d $p=0,04$ ^e $p=0,05$

A OR calculada por regressão logística para esse SNP, tendo CT como o genótipo de risco, não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama (OR de 0,975; IC95% 0,500-1,902; Wald de 0,006; p de 0,941), sendo que os valores encontrados foram bastante semelhantes com aqueles calculados pelo método convencional. O mesmo foi observado com as ORs calculadas para a combinação de *Arg194Trp* com o SNP *MnSOD Val-9Ala* e de *Arg194Trp* com *COMT Val158Met*. Não foi possível calcular a OR para a combinação de *Arg194Trp* com *XRCC1 Arg399Gln*, devido ao número insuficiente de indivíduos com a combinação dos genótipos considerados de risco para esses SNPs (CT e AA respectivamente); isso se deu à baixa frequência do alelo variante de *Arg194Trp* aliada ao número de indivíduos reduzido da população estudada. Devido a esse mesmo motivo, não foi possível calcular as ORs para a combinação de *Arg194Trp* com os fatores epidemiológicos e clínicos considerados de risco para a doença.

Através de regressão logística multivariada o SNP *Arg194Trp* se fez presente nos modelos finais daqueles propostos no modelo 1 (interação que reuniu todos os SNPs estudados nesse trabalho) e no modelo 3 (interação que reuniu todos os SNPs e os fatores epidemiológicos e clínicos que apresentaram maiores ORs preliminares), mostrando sua importância para esses modelos propostos. Já para o modelo 2 (interação que reuniu todos os SNPs e todos os fatores epidemiológicos e clínicos estudados nesse trabalho) o SNP *Arg194Trp* foi retirado do modelo final, mostrando que havia fatores presentes nesse modelo de maior impacto para a doença que o mesmo. Não há dados na literatura que permitam a comparação com os dados apresentados acima.

7.2.2. SNP *Arg399Gln*

As frequências genotípicas do SNP *Arg399Gln* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto em casos como em controles da população aqui estudada, assim como nas populações dos estudos presentes na Tabela 21. A frequência do alelo variante foi de 0,378 e 0,328 para casos e controles respectivamente. Essas frequências são semelhantes àsquelas encontradas nas populações de portugueses, chiprianos, norte-americanos (brancos), poloneses, indianos (somente o grupo de casos), canadenses e turcos (SILVA *et al.*, 2007; LOIZIDOU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006; PACHKOWSKI *et al.*, 2006; THYAGARAJAN *et al.*, 2006; CHACKO *et al.* 2005; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; DELIGEZER; DALAY, 2004; DUELL *et al.*, 2001). As frequências alélicas (alelo variante) encontradas nas populações de norte-americanos afro-descendentes (PACHKOWSKI *et al.*, 2006; DUELL *et al.*, 2001), indianos (somente no grupo de controles - CHACKO *et al.* 2005), finlandeses (METSOLA *et al.*, 2005) e tailandeses (SANGRAJRANG *et al.*, 2007) são inferiores ou um pouco inferiores se comparadas àsquelas encontradas no presente trabalho. Ainda sobre as frequências alélicas, o estudo realizado por THYAGARAJAN *et al.* (2006) em norte-americanos mostra que a frequência do alelo variante (somente no grupo de casos) é maior que a encontrada no presente trabalho. Na Figura 27 estão apresentadas as frequências do alelo variante de *XRCC1 Arg399Gln* relatadas em uma meta-análise realizada por SAADAT e ANSARI-LARI (2008) para várias populações.

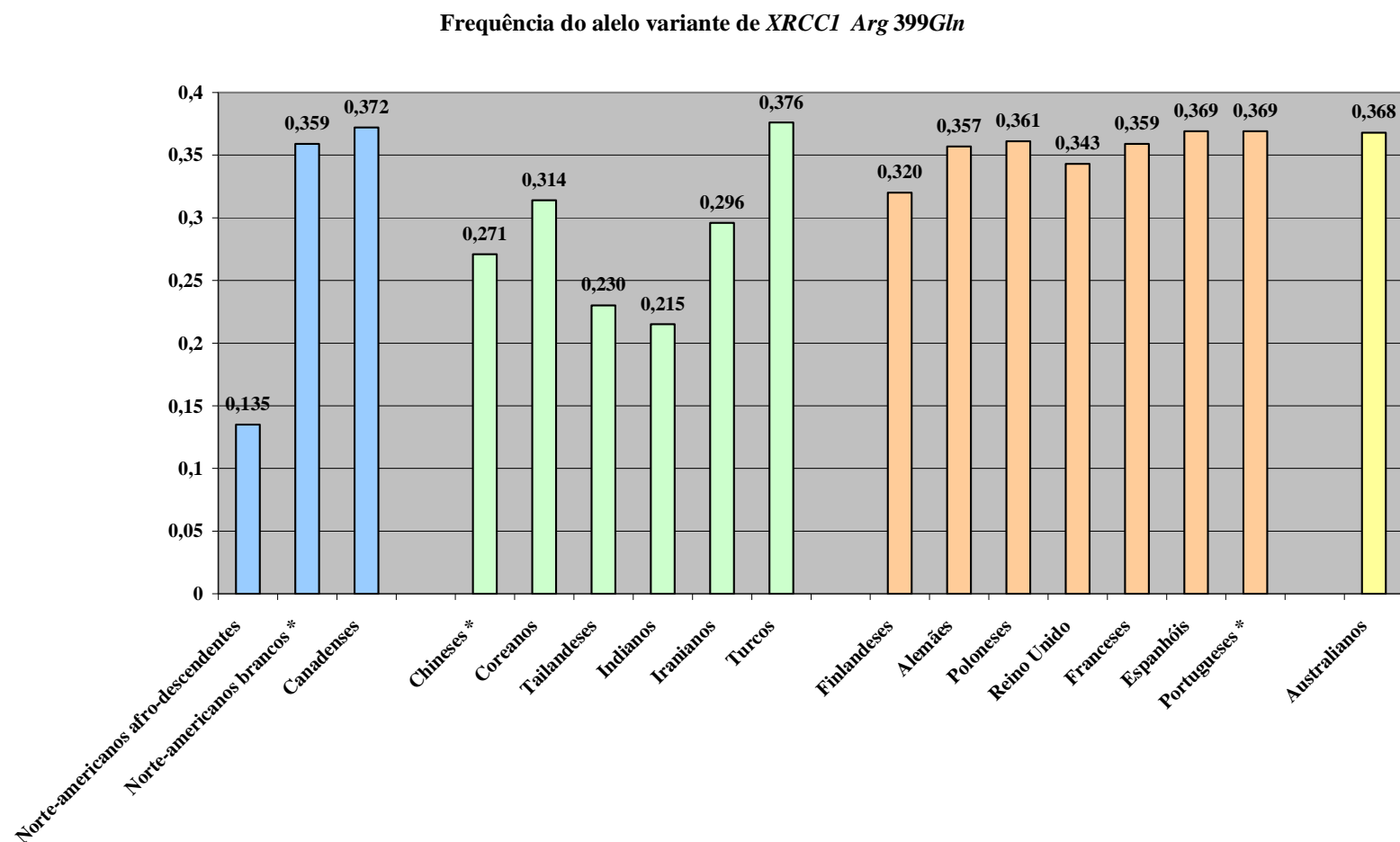


Figura 27. Frequências do alelo variante de *XRCC1* Arg399Gln em várias populações reportadas por SAADAT e ANSARI-LARI (2008). Para as populações com o símbolo * são relatadas as médias das frequências alélicas.

Através da análise dos dados sobre frequências alélicas apresentados, pode-se observar que a frequência do alelo variante para o SNP *Arg399Gln*, é um pouco inferior em asiáticos e inferior em afro-descendentes se comparadas às populações européias ou de ascendência predominantemente européia. As frequências alélicas encontradas no presente trabalho se assemelham àquelas de populações européias, o que condiz com a origem geográfica predominante dos ancestrais da população aqui apresentada.

A OR calculada para a presença do alelo A não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama no presente trabalho.

De acordo com o cálculo de OR, não há associação do genótipo GA com o câncer de mama para a população estudada (OR de 1,131; IC95% 0,669-1,913; p de 0,716). Os estudos apresentados na Tabela 21 corroboram esse dado com exceção do estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005) que encontraram associação do genótipo GA com câncer de mama, (OR sem ajuste de 2,02; IC95% 1,16-3,49) estatisticamente significativa ($p=0,01$). CHACKO *et al.* (2005) também encontraram associação estatisticamente significativa com o câncer de mama quando a OR foi ajustada para idade e status da menopausa (OR de 2,04; IC 95% 1,16-3,58; p de 0,012).

A OR calculada para o genótipo AA foi de 1,670 com IC95% de 0,739-3,803 e p de 0,250, mostrando que não há associação do genótipo AA com o câncer de mama na população estudada. Esse dado se assemelha com os resultados dos estudos presentes na Tabela 21, exceto novamente para o estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005) que encontraram associação do genótipo AA com câncer de mama tanto quando a OR foi calculada sem ajuste (OR de 2,66; IC95% 1,10-6,40; p de 0,012) como quando foi ajustada para idade e status da menopausa (OR de 2,69; IC 95% 1,10-6,57; p de 0,028).

Também não foi encontrada associação significativa da combinação dos genótipos GA e AA com o câncer de mama para a população estudada (OR de 1,231; IC95% 0,750-2,021; p de 0,453). Os estudos realizados por SILVA *et al.* (2007), THYAGARAJAN *et al.* (2006), METSOLA *et al.* (2005), FIGUEIREDO *et al.* (2004), DELIGEZER e DALAY (2004) apresentam dados semelhantes a esse (dados não mostrados). Mais uma vez, no estudo realizado por CHACKO *et al.* (2005), há relatado associação estatisticamente significativa dessa combinação de genótipos (GA e AA) com câncer de mama, tanto quando a OR foi calculada sem ajuste (OR de 2,14; IC95% 1,29-3,58; p de 0,003) como quando foi ajustada para idade e status da menopausa (OR de 2,18; IC 95% 1,30-3,66; p de 0,003).

Tabela 21. Estudos de associação caso-controle realizados com o SNP *XRCC1* Arg399Gln e câncer de mama

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo A) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) GG/GA/AA	OR ₂ ^c (CI 95%) GG/GA/AA
SANGRAJRANG <i>et al.</i> , 2007	507 / 425 Tailandeses	Médias: 48,0 ±10,0/ 45,3 ±12,2	0,27 / 0,23	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				1,17 (0,89-1,53)	1,20 (0,90-1,60)
				1,74 (0,99-3,10)	1,80 (0,99-3,29)
SILVA <i>et al.</i> , 2007	241 / 457 Portugueses	NI	0,32 / 0,35	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				0,84 (0,60-1,16)	0,87 (0,62-1,22)
				0,80 (0,60-1,14)	0,87 (0,51-1,50)
LOIZIDOU <i>et al.</i> , 2007	1.109 / 1.177 Chiprianos	40-70 / 40-70 Média: 56,0 / 56,0	0,33 / 0,34	1,00 (Ref)	-
				0,95 (0,80-1,14)	-
				0,90 (0,68-1,18)	-
ZHANG <i>et al.</i> , 2006	1.580 / 1.253 Norte-americanos	20-74 / 20-74	0,36 / 0,36	1,00 (Ref)	-
				1,10 (0,90-1,20)	-
				0,90 (0,80-1,10)	-
PACHKOWSKI <i>et al.</i> , 2006	1.195 / 2.296 Poloneses	20-74 / NI	0,37 / 0,36	1,00 (Ref)	-
				1,10 (1,00-1,30)	-
				1,10 (0,90-1,40)	-
PACHKOWSKI <i>et al.</i> , 2006	787 / 718 Norte-americanos afro-descendentes	NI	0,16 / 0,14	1,00 (Ref)	-
				1,10 (0,90-1,50)	-
				1,80 (0,80-1,50)	-
THYAGARAJAN <i>et al.</i> , 2006	1.016 / 746 Norte-americanos brancos	NI	0,36 / 0,35	1,00 (Ref)	-
				1,00 (0,80-1,30)	-
				1,10 (0,90-1,30)	-
CHACKO <i>et al.</i> , 2005	460 / 324 Norte-americanos	NI	0,51 / 0,36	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				1,29 (0,85-1,95)	1,29 (0,84-1,97)
				0,91 (0,49-1,70)	0,91 (0,48-1,72)
CHACKO <i>et al.</i> , 2005	123 / 123 Indianos	NI	0,34 / 0,21	1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
				2,02 (1,16-3,49) ^d	2,04 (1,16-3,58) ^f
				2,66 (1,10-6,40) ^e	2,69 (1,10-6,57) ^g

Continuação da Tabela 21

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo A) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) GG/GA/AA	OR ₂ ^c (CI 95%) GG/GA/AA
BREWSTER <i>et al.</i> , 2006	321 / 321 Norte-americanos	NI	-	1,00 (Ref) 1,48 (0,92-2,38) 1,11 (0,67-1,83)	-
METSOLA <i>et al.</i> , 2005	483 / 482 Finlandeses	Médias: 58,9 / 53,5	0,30 / 0,27	1,00 (Ref) 1,24 (0,93-1,65) 1,39 (0,84-2,29)	-
FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2004	402 ^h / 402 Canadenses	25-54 / 20-54	0,36 / 0,37	1,00 (Ref) 0,92 (0,68-1,24) 0,92 (0,60-1,41)	1,00 (Ref) 0,91 (0,67-1,23) 0,88 (0,57-1,37)
DELIGEZER; DALAY, 2004	151 / 133 Turcos	29-75 / 23-70 Médias: 51,5 ±11,2/ 41,0 ±11,3	0,40 / 0,37	1,00 (Ref) 0,89 (0,53-1,47) 1,27 (0,61-2,61)	-
DUELL <i>et al.</i> , 2001	161 / 166 Norte-americanos	Médias: 50,5 / 51,6	0,19 / 0,14	-	-
	afro-descendentes				
	251 / 234 Norte-americanos brancos		0,35 / 0,36	-	-

NI: não informado

^a OG: origem geográfica^b OR₁: OR não ajustado^c OR₂: OR ajustado para parâmetros epidemiológicos^d $p=0,01$ ^e $p=0,02$ ^f $p=0,012$ ^g $p=0,028$ ^h Somente pacientes diagnosticadas com menos de 55 anos

A OR calculada por regressão logística (AA como o genótipo de risco), não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama (OR de 1,579; IC95% 0,777-3,208; Wald de 1,579; p de 0,207) e se assemelhou à OR calculada pelo método convencional.

Nas análises de combinação de SNPs, dois a dois, não se encontrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama para a combinação de *Arg399Gln* com o SNP *MnSOD Val-9Ala*. Quando se realizou a combinação de *Arg399Gln* com o SNP *COMT Val158Met*, a OR mostrou associação com o câncer de mama estatisticamente significativa (OR 3,909; IC95% 1,078-14,176; Wald de 4,302; p de 0,038), ou seja, uma mulher portadora do genótipo AA para *Arg399Gln* e AA para *COMT Val158Met* possui aproximadamente quatro vezes mais chance de desenvolver câncer de mama comparada a uma mulher que possui qualquer outra combinação de genótipos para esses dois SNPs. Não há dados na literatura para comparação com os dados apresentados. Porém, pode-se hipotetizar que, sendo o reparo de DNA e o processo de detoxificação mecanismos altamente relacionados (agem na proteção do DNA), possa realmente haver aumento do risco de desenvolver doença quando duas proteínas de importância para esses dois processos apresentam alguma falha ou diminuição na atividade devido a, por exemplo, polimorfismos presentes nos genes que as codificam. Não foi possível calcular a OR para a combinação de *Arg399Gln* com *XRCC1 Arg194Trp*, devido ao número insuficiente de indivíduos com a combinação dos genótipos considerados de risco para esses SNPs (AA e CT respectivamente); isso se deu à baixa frequência do alelo variante de *XRCC1 Arg194Trp* aliada ao número de indivíduos reduzido da população estudada.

Nenhuma associação com o câncer de mama estatisticamente significativa foi encontrada quando se combinou *Arg399Gln* com as características epidemiológicas e clínicas.

Não foi possível analisar a combinação do SNP com as características “idade da menarca” e “idade da primeira gestação” devido à baixa taxa de indivíduos com as combinações das classes consideradas de risco para essas variáveis.

Nas análises de regressão logística multivariada o SNP *Arg399Gln* não foi removido dos modelos finais daqueles propostos no modelo 1 (interação que reuniu todos os SNPs estudados nesse trabalho) e no modelo 3 (interação que reuniu todos os SNPs e os fatores epidemiológicos e clínicos que apresentaram maiores ORs preliminares), mostrando que esse SNP possui importância para esses dois modelos propostos. No modelo 2 (interação que reuniu todos os SNPs e todos os fatores epidemiológicos e clínicos estudados nesse trabalho), *Arg399Gln* foi retirado do modelo final, uma vez que o ensaio considerou esse SNP de menor importância para o modelo, devido ao teste de Wald ter sido de baixo valor. Não há dados na literatura que permitam a comparação com os dados apresentados acima.

7.3. GENE *COMT*

Os estrógenos apresentam um papel de grande relevância para o desenvolvimento de câncer de mama. Estes hormônios, que agem como reguladores do ciclo celular (ONAY *et al.*, 2008), podem tanto estimular a transcrição de genes, via receptor de estrogênio, necessário para a proliferação celular, como causar danos ao DNA através de metabólitos intermediários como o catecol-estrogênio ou outros que podem se ligar ao DNA. Devido a esses fatos, o estrogênio é hoje considerado um carcinógeno (ONAY *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2007).

A Catecol-O-Metiltransferase (COMT) é uma enzima que catalisa a metilação de várias substâncias endógenas e xenobióticos, prevenindo a formação de quinonas e espécies reativas de oxigênio, protegendo o DNA de danos oxidativos (SILVA *et al.*, 2006). COMT é considerada uma enzima de fase II e catalisa a adição de um grupo metil à metabólitos catecol-estrogênio convertendo-os em metoxiestrogênios (ONAY *et al.*, 2008; GAUDET *et al.*, 2006). A maior parte da detoxificação realizada por COMT ocorre no fígado, mas também pode ocorrer em tecidos periféricos, incluído o tecido mamário – a expressão de *COMT* é elevada em tecido tumoral (ONAY *et al.*, 2008).

Sugere-se que o alelo variante de *COMT Val158Met* resulte em uma enzima com atividade reduzida de três a quatro vezes se comparado àquela resultante da presença do alelo selvagem (ONAY *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

Na Tabela 22 estão apresentados alguns estudos da literatura caso-controle realizados com o polimorfismo *COMT Val158Met* e câncer de mama. As frequências genotípicas desse SNP encontradas na população estudada estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como nos estudos presentes na Tabela 23 com exceção daqueles realizados por HU *et al.* (2007), SILVA *et al.* (2006) e SAZCI *et al.* (2004) que não apresentaram dados sobre o EHW. As frequências do alelo variante de *Val158Met* para a população estudada

foram de 0,521 e 0,463 para casos e controles, respectivamente e se assemelham às frequências encontradas nas populações de canadenses, finlandeses, alemães, poloneses e turcos (somente o grupo de casos) (ONAY *et al.*, 2008; JUSTENHOVEN *et al.*, 2008; GAUDET *et al.*, 2006; SAZCI *et al.*, 2004; MITRUNEN *et al.*, 2001). Já para as populações de chineses, as frequências encontradas por HU *et al.* (2007), LIN *et al.* (2005) e WEN *et al.* (2005) são inferiores se comparadas àquelas do presente trabalho. Também há uma diferença nas frequências do alelo variante para populações de norte-americanos (MARCHAND *et al.*, 2005), turcos (somente grupo controle - SAZCI *et al.*, 2004) e índios xavantes brasileiros que são um pouco menores que aquelas encontradas nesse trabalho. A diferença encontrada em norte-americanos provavelmente deve-se ao fato de que a população escolhida para o estudo realizado por MARCHAND *et al.* (2005) ser bastante miscigenada, com indivíduos de origens geográficas bastante diferentes. Através da análise da população de índios xavantes que são provenientes do Brasil, podemos observar que a predominância da origem geográfica euro-descendente na população brasileira estudada no presente trabalho, pode ser a responsável pelo aumento das frequências do alelo variante de *COMT Val158Met*, uma vez que, observando os estudos citados, essas frequências se assemelham muito mais àquelas encontradas em populações européias ou de ascendência predominantemente européia.

Através do cálculo de OR, a presença do alelo variante A não apresentou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama no presente trabalho.

Também não se encontrou associação do genótipo GA com o câncer de mama para a população estudada (OR de 1,963; IC95% 0,527-1,757; *p* de 1,000). Os estudos apresentados na Tabela 22 também não mostraram associação do genótipo heterozigoto para esse SNP com o câncer de mama.

Para o genótipo AA, a OR calculada foi de 1,538 com IC95% de 0,773-3,067 e p de 0,245, mostrando que também não há associação do genótipo AA com o câncer de mama. Esse dado se assemelha com os resultados dos estudos presentes na Tabela 22, exceto para os estudos realizados por HU *et al.* (2007) e SAZCI *et al.* (2004) que encontraram associação estatisticamente significativa do genótipo AA com câncer de mama (OR de 3,72; IC95% 0,99-13,96; p de 0,05 para o estudo de HU *et al.* e OR de 2,28; IC 95% 1,27-4,11; p de 0,005 para o estudo de SAZCI *et al.*).

Para a combinação dos genótipos GA e AA também não se encontrou associação com o câncer de mama (OR de 1,144; IC95% 0,658-1,991; p de 0,707). Em um estudo realizado por ONAY *et al.* (2008), assim como no presente trabalho, não se encontrou associação dessa combinação de genótipos com o câncer de mama (dado não mostrado).

Tabela 22. Estudos de associação caso-controle realizados para o SNP *COMT Val158Met* e câncer de mama

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo A) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) GG/GA/AA	OR ₂ ^c (CI 95%) GG/GA/AA
ONAY <i>et al.</i> , 2008	1.228 / 719 Canadenses	25-69 / 23-69	0,49 / 0,53	1,00 (Ref)	-
		Médias: 48,8 ±9,26/ 49,1 ±9,55		1,30 (1,07-0,68) 1,40 (1,07-1,81)	
	728 / 687 Finlandeses	22-69 / 21-65	0,54 / 0,55	1,00 (Ref)	-
		Médias: 53,2 ±9,34/ 47,1 ±10,12		1,10 (0,85-1,43) 1,40 (0,73-1,39)	
JUSTENHOVEN <i>et al.</i> , 2008	688 / 724 Alemães	NI	0,48 / 0,48	-	1,00 (Ref) 0,99 (0,76-1,30) 1,04 (0,76-1,44)
HU <i>et al.</i> , 2007	121 / 114 Chineses	NI	0,26 / 0,15	1,00 (Ref) 0,89 (0,51-1,57) 3,72 (0,99-13,96) ^d	-
SILVA <i>et al.</i> , 2006	- / 179 ^e Indígenas Xavantes	NI	- / 0,34	-	-
GAUDET <i>et al.</i> , 2006	1.983 / 2.279 Poloneses	20-74 / 20-74	0,59 / 0,52	1,00 (Ref) 1,09 (0,93-1,27) 1,10 (0,93-1,30)	-
MARCHAND <i>et al.</i> , 2005	1.339 / 1.370 Norte-americanos ^f	Médias: 66 / 63	0,38 / 0,37	1,00 (Ref) 1,00 (0,90-1,20) 0,90 (0,70-1,20)	1,00 (Ref) 1,00 (0,8-1,2) 0,90 (0,7-1,2)

Continuação da Tabela 22

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo A) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) GG/GA/AA	OR ₂ ^c (CI 95%) GG/GA/AA
LIN <i>et al.</i> , 2005	87 / 341 Chineses	30-64 / 30-64	0,24 / 0,25	- 0,87 1,04	-
WEN <i>et al.</i> , 2005	1.120 / 1.191 Chineses	25-64 / NI	0,26 / 0,27	1,00 (Ref) 0,93 (0,78-1,10) 0,67 (0,67-1,26)	-
SAZCI <i>et al.</i> , 2004	130 ^g / 233 Turcos	20-42 / 19-43 Médias: 36,58 ±9,02/ 36,11 ±10,14	0,48 / 0,38	0,94 (0,57-1,53) 0,67 (0,43-1,04) 2,28 (1,27-4,11) ^h	-
MITRUNEN <i>et al.</i> , 2001	Finlandeses	Médias: 58,7 / 53,5	0,51 / 0,54		1,00 (Ref) 0,84 (0,59-1,20) 0,75 (0,51-1,11)

NI: não informado

^a OG: origem geográfica^b OR₁: OR não ajustado^c OR₂: OR ajustado para parâmetros epidemiológicos^d $p=0,05$ ^e População sem câncer de mama usada no estudo para comparação^f inclui japoneses, caucasóides, afro-americanos, latinos e havaianos nativos^g Casos em pré-menopausa^h $p=0,005$

A OR calculada por regressão logística (AA como o genótipo de risco), não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama (OR de 1,643; IC95% 0,958-2,818; Wald de 1,643; p de 0,071) e se assemelhou à OR calculada pelo método convencional, porém nota-se que o valor de p por regressão logística foi reduzido drasticamente, provavelmente pelo fato do teste apresentar maior poder de precisão.

Através das análises de combinação de SNPs, a combinação de *Val158Met* com *XRCC1 Arg194Trp* não apresentou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama na população estudada. Já para a combinação de *Val158Met* com *XRCC1 Arg399Gln*, como já relatado no item 7.2.2., a OR mostrou associação com o câncer de mama estatisticamente significativa. Também se encontrou associação estatisticamente significativa com a doença para a combinação de *Val158Met* com *MnSOD Val-9Ala* (OR de 2,129; IC95% 1,049-4,323; Wald de 4,375; p de 0,036). Essa associação poderia aumentar em aproximadamente duas vezes a chance de desenvolver câncer de mama caso a mulher fosse portadora da combinação de genótipos AA *COMT Val158Met* e TC para *MnSOD Val-9Ala*. Como já explanado nesse trabalho, esses dois genes codificam enzimas importantes para mecanismos de detoxificação no organismo humano e estão intimamente relacionados aos mecanismos que podem conduzir o aparecimento de células cancerosas; sendo assim, é totalmente plausível que a combinação de polimorfismos nesses genes, que podem levar à diminuição da atividade enzimática da proteína codificada, possa agir no aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Quando se combinou *COMT Val158Met* com cada característica epidemiológica e clínica, nenhuma associação com o câncer de mama estatisticamente significativa foi encontrada.

Para as análises de regressão logística multivariada o SNP *COMT Val158Met* só não foi removido do modelo final daquele proposto no modelo 1 (interação que reuniu todos os SNPs estudados nesse trabalho), se mostrando, portanto, significativo para esse modelo. Já para os dois modelos restantes, modelo 2 (interação que reuniu todos os SNPs e todos os fatores epidemiológicos e clínicos estudados nesse trabalho) e modelo 3 (interação que reuniu todos os SNPs e os fatores epidemiológicos e clínicos que apresentaram maiores ORs preliminares), o SNP *COMT Val158Met* não se fez presente no modelo final, ou seja, o teste não o considerou de importância para o ajuste do modelo inicial proposto. Não há dados na literatura que permitam a comparação com os dados apresentados acima.

7.4. GENE *MnSOD*

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas em várias vias metabólicas como a do metabolismo de estradiol, de gorduras poliinsaturadas, etanol, xenobióticos, entre outras. ROS estão envolvidas com a etiologia de diversas doenças humanas, incluindo o câncer (MARTIN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Vários estudos já demonstraram que o stress oxidativo pode induzir morte celular, resultado dos danos excessivos causados ao DNA associado à diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

As superóxido dismutases (SODs) são uma família de enzimas antioxidantes responsáveis por detoxificação. Superóxido dismutases, como a MnSOD catalisam a transformação de radicais superóxidos (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), que são menos danosos ao organismo (MARTIN *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de câncer de mama pode ter ligação com o nível de stress oxidativo, particularmente quando ocorre perda do balanço entre a quantidade de ROS geradas e a capacidade das defesas oxidativas (MARTIN *et al.*, 2006).

O polimorfismo *Val-9Ala* de *MnSOD* pode impedir o correto direcionamento da enzima para a matriz mitocondrial, podendo causar alterações na atividade enzimática de MnSOD (CHOI *et al.*, 2007).

Na Tabela 23 estão apresentados os resultados de alguns estudos da literatura de associação caso-controle realizados para o SNP *MnSOD Val-9Ala* e câncer de mama. A distribuição das frequências genotípicas de *Val-9Ala* na população estudada nesse trabalho encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg somente para o grupo de controles, mostrando que há uma diferença entre as frequências genotípicas de casos e controles. Dos estudos relacionados na Tabela 23, somente aqueles publicados por SILVA *et al.* (2006), MILLKAN *et al.* (2004), TAMIMI *et al.* (2004) e CAI *et al.* (2004) apresentam dados sobre o EHW,

sendo que todas as populações estudadas nesses trabalhos estão de acordo com o teorema, com exceção daquele realizado por MILLKAN *et al.* (2004). Esse estudo relata que o grupo de controles dos norte-americanos afro-descendentes e o grupo de casos dos norte-americanos brancos não estão em EHW, devido ao excesso de heterozigotos nesses dois grupos, assim como o que foi observado para o grupo de casos do presente trabalho.

As frequências do alelo variante para esse SNP foram de 0,474 e 0,451 em casos e controles respectivamente. Essas frequências se assemelham àquelas encontradas nas populações de portugueses, norte-americanos (tanto afro-descendentes como brancos) e canadenses (SILVA *et al.*, 2006; MILLKAN *et al.*, 2004; TAMIMI *et al.* 2004; KNIGHT *et al.*, 2004; EGAN *et al.*, 2003; AMBROSONE *et al.*, 1999). Porém, essas frequências são superiores àquelas encontradas nas populações de chineses (CAI *et al.*, 2004). Na população de índios brasileiros xavantes a frequência do alelo variante é bastante superior (SILVA *et al.*, 2006) se comparada às frequências encontradas nesse trabalho. De acordo com dados publicados por AMBROSONE *et al.* (1999), observa-se que a frequência desse alelo também é um pouco maior no grupo de casos.

De acordo com os dados acima, as frequências para o alelo variante de *MnSOD Val-9Ala* para a população aqui estudada parecem ser superiores em relação à população asiática, semelhantes àquelas encontradas em populações européias ou de ascendência predominantemente européia, bem como em afro-descendentes e inferiores se comparadas à população de indígenas brasileiros, mostrando mais uma vez, a caracterização da população alvo desse trabalho, que é descendente de populações de origem geográfica predominantemente européia.

A OR calculada para a presença do alelo C não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama no presente trabalho.

A OR calculada para o genótipo TC foi de 1,248 (IC95% 0,699-2,230) com p de 0,509, mostrando que não há associação desse genótipo com o câncer de mama para a população estudada, assim como todos os estudos relatados na Tabela 23.

Para o genótipo CC, a OR calculada foi de 1,213 com IC95% de 0,565-2,609 e p de 0,719, mostrando que também não há associação do genótipo CC com o câncer de mama. Os estudos presentes Tabela 23, assim como o relatado, também não apresentam qualquer associação estatisticamente significativa, apesar de alguns dos valores de ORs apresentados (AMBROSONE *et al.*, 1999) serem relativamente altos.

A OR calculada para os genótipos TC e CC em combinação foi de 1,240 (IC95% 0,710-2,164) com p de 0,502, descartando a possibilidade de associação da combinação desses genótipos com o câncer de mama para a população estudada. O estudo realizado por MILLKAN *et al.* (2004) também não encontrou associação dessa combinação de genótipos com a doença.

Tabela 23. Estudos de associação caso-controle realizados para o SNP *MnSOD Val-9Ala* e câncer de mama

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo C) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) TT/TC/CC	OR ₂ ^c (CI 95%) TT/TC/CC
SILVA <i>et al.</i> , 2006	241 / 457 Portugueses	NI	0,45 / 0,48	1,00 (Ref) 0,88 (0,61-1,30) 0,74 (0,44-1,22)	1,0 (Ref) 0,86 (0,58-1,27) 0,73 (0,43-1,23)
	- / 179 ^d Indígenas Xavantes	NI	- / 0,77	-	-
	760 / 677			1,00 (Ref)	
MILLKAN <i>et al.</i> , 2004	Norte-americanos afro-descendentes	NI	0,41 / 0,45	0,80 (0,60-1,00) 0,80 (0,60-1,10)	-
	1.265 / 1.135			1,00 (Ref)	
	Norte-americanos brancos	NI	0,51 / 0,51	1,20 (0,90-1,40) 1,10 (0,80-1,40)	-
TAMIMI <i>et al.</i> , 2004	968 / 1.205			1,00 (Ref)	1,00 (Ref)
	Norte-americanos	NI	0,49 / 0,50	0,90 (0,72-1,11) 0,96 (0,75-1,23)	0,88 (0,70-1,10) 0,96 (0,74-1,24)
KNIGHT <i>et al.</i> , 2004	399 / 372			1,00 (Ref)	
	Canadenses	NI	0,50 / 0,50	0,81 (0,57-1,14) 1,02 (0,68-1,51)	-

Continuação da Tabela 23

Referência	N Caso/Controle OG ^a	Idade (anos) Casos/Controles	Frequência (alelo C) Casos/Controles	OR ₁ ^b (CI 95%) TT/TC/CC	OR ₂ ^c (CI 95%) TT/TC/CC
CAI <i>et al.</i> , 2004	1.125 / 1.197 Chineses	NI	0,14 / 0,14	1,00 (Ref) 1,00 (0,80-1,20) 1,30 (0,70-2,30)	-
EGAN <i>et al.</i> , 2003	476 / 502 Norte-americanos	Médias: 54,6 / 54,6	0,52 / 0,49	1,00 (Ref) 1,28 (0,93-1,77) 1,13 (0,78-1,64)	1,00 (Ref) 1,27 (0,91-1,77) 1,18 (0,81-1,73)
AMBROSONE <i>et al.</i> , 1999	100 ^e / 100 Norte-americanos	Médias: 46,7 ±4,3/ 47,0 ±3,8	0,59 / 0,43	1,00 (Ref) 1,30 (0,60-2,80) 3,00 (1,40-6,80)	1,00 (Ref) 1,30 (0,60-2,90) 4,30 (1,70-10,80)
	152 ^f / 185 Norte-americanos	Médias: 63,0 ±7,7/ 62,4 ±7,1		1,00 (Ref) 1,30 (0,70-2,30) 1,80 (0,90-3,60)	1,00 (Ref) 0,84 (0,59-1,20) 1,80 (0,90-3,60)

NI: não informado

^a OG: origem geográfica^b OR₁: OR não ajustado^c OR₂: OR ajustado para parâmetros epidemiológicos^d População sem câncer de mama usada no estudo para comparação^e Pacientes em pré-menopausa^f Pacientes em pós-menopausa

A OR calculada por regressão logística (CT como o genótipo de risco), não mostrou associação estatisticamente significativa com o câncer de mama (OR de 1,132; IC95% 0,715-1,792; Wald de 0,280; p de 0,597) e se assemelhou à OR calculada pelo método convencional.

Quando se realizou análise da combinação de SNPs, a combinação de *MnSOD Val-9Ala* com *COMT Val158Met* mostrou associação estatisticamente significativa e já previamente relada no item 7.3. As combinações restantes, tanto de *MnSOD Val-9Ala* com *XRCC1 Arg194Trp* como *XRCC1 Arg399Gln*, não mostraram associação estatisticamente significativa com o câncer de mama, na população estudada.

Das combinações do SNP com as características epidemiológicas e clínicas, nenhuma associação com o câncer de mama foi encontrada, apesar da combinação de *MnSOD Val-9Ala* com a característica “ex-tabagista” (mulheres que já fumaram, mas que hoje não fumam mais) ter apresentado um valor de OR interessante e muito próximo da significância (OR de 2,437; IC95% 0,995-5,968; Wald de 3,799; p de 0,051).

Para os modelos propostos e analisados por regressão logística multivariada, o SNP *MnSOD Val-9Ala* se fez presente nos modelos 1 (interação que reuniu todos os SNPs estudados nesse trabalho) e 2 (interação que reuniu todos os SNPs e todos os fatores epidemiológicos e clínicos estudados nesse trabalho), uma vez que apresentou valores do teste de Wald compatíveis com sua permanência nesses modelos. Já para o modelo 3 (interação que reuniu todos os SNPs e os fatores epidemiológicos e clínicos que apresentaram maiores ORs preliminares), esse SNP não está presente no modelo final mostrando que não apresenta valores do teste de Wald compatíveis com sua permanência no mesmo. Não há dados na literatura que permitam a comparação com os dados apresentados acima.

7.5. MODELOS DE INTERAÇÃO DE FATORES DE RISCO

A análise por regressão logística multivariada de modelos de interação entre variáveis foi realizada com o intuito de verificar se as características estudadas no presente trabalho, tanto genéticas (polimorfismos tipo SNP em genes de interesse) como epidemiológicas e clínicas poderiam realmente ter significado para o desenvolvimento do câncer de mama e como elas poderiam agir na etiologia da doença.

Dos três modelos propostos, aquele que melhor se ajustou a esse objetivo foi o modelo 3, pois comparativamente possui:

- os melhores valores dos testes de Hosmer & Lemeshow (χ^2 de 1,375 e p de 0,927) e Nagelkerke R^2 (0,095 – 9,5%), que demonstram que o modelo final proposto é adequado e pode explicar cerca de 9,5% dos eventos relacionados à doença;
- os maiores valores de OR, mostrando que as variáveis presentes no modelo estão contribuindo para o aumento do risco de câncer de mama (com intervalos de confiança aceitáveis);
- os maiores valores dos testes de Wald, que exprimem o quanto essas variáveis individualmente estão relacionadas com o câncer de mama;
- os melhores valores de p (significativos ou mais próximos da significância) que exprimem a real probabilidade desses testes serem ou não verdadeiros.

Mesmo observando que o melhor modelo é aquele que apresenta como variáveis tanto características genéticas (SNPs *XRCC1 Arg194Trp* e *XRCC1 Arg399Gln*) como epidemiológicas (idade da menarca, nuliparidade, tabagismo e ex-tabagismo), não é possível afirmar que esse modelo é absolutamente correto, pois as probabilidades individuais de que algumas das variáveis inseridas nesse modelo serem falsas são altas (valores de p não significativos).

Apesar de já estar estabelecido que o câncer de mama é uma doença de etiologia complexa, tendo fatores genéticos, ambientais e comportamentais influenciando no seu processo de desenvolvimento, existe ainda uma grande dificuldade por parte da comunidade científica em determinar quais, quanto e como são os mecanismos de ação e interação entre esses fatores variados.

Sendo assim, de acordo com os dados apresentados nesse trabalho, houve uma tentativa em elucidar como um pequeno grupo de características poderia contribuir para o câncer de mama em uma população específica, porém há necessidade clara do aprimoramento de algumas tarefas, como o aumento do número de indivíduos presentes na amostra populacional e a melhoria da coleta de dados, que permitiriam a realização de análises estatísticas mais refinadas.

Nesse trabalho, procuramos entender algum destes mecanismos, analisando a interação de um pequeno grupo de características genéticas, epidemiológicas e clínicas na contribuição da etiologia e/ou desenvolvimento do câncer de mama. Apesar dos nossos dados terem demonstrado achados interessantes, tais como a interação destas características observadas no modelo de interação número 3, torna-se claro a necessidade de análises adicionais, em amostras populacionais maiores e com um sistema de coleta de dados aprimorado, permitindo a realização de análises estatísticas mais refinadas.

8. CONCLUSÕES

- Foram estabelecidos e aperfeiçoados bancos de DNA compostos de amostras biológicas coletadas de mulheres saudáveis não afetadas por câncer de mama e sem histórico familiar da doença e de mulheres afetadas por câncer de mama livres de tratamento quimioterápico e/ou radioterápico prévio do estado de Santa Catarina.

- Estabeleceu-se um banco de dados baseado na amostra populacional do estado de Santa Catarina contendo os genótipos dos SNPs *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg399Gln*, *COMT Val158Met* e *MnSOD Val-9Ala* conjuntamente com os dados clínicos e epidemiológicos presentes nos questionários obtidos das participantes dessa amostra.

- Foram identificadas as frequências dos polimorfismos tipo SNP em genes de interesse estudados. As frequências dos alelos variantes obtidas para casos e controles respectivamente, foram:

- *XRCC1 Arg194Trp*: 0,378 e 0,328 (alelo A);

- *XRCC1 Arg399Gln*: 0,079 e 0,089 (alelo T);

- *COMT Val158Met*: 0,521 e 0,463 (alelo A);

- *MnSOD Val-9Ala*: 0,474 e 0,451 (alelo C).

- Não foi constatada associação estatisticamente significativa entre os SNPs analisados de forma individual e o câncer de mama.

- Foi encontrada associação positiva (risco) estatisticamente significativa para a combinação dos SNPs *XRCC1 Arg399Gln* e *COMT Val158Met* com o câncer de mama.

- Foi encontrada associação positiva (risco) estatisticamente significativa para a combinação dos SNPs *MnSOD Val-9Ala* e *COMT Val158Met* com o câncer de mama.
- Foi observada ausência de associação significativa entre os fatores epidemiológicos e clínicos e o câncer de mama, quando estes foram analisados isoladamente.
- Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a combinação dos SNPs e dos fatores epidemiológicos e clínicos com o câncer de mama.
- Foi observado que, apesar de um modelo proposto (modelo número 3) ter melhor representado a interação entre as características genéticas, clínicas e epidemiológicas e o câncer de mama, não podemos afirmar com absoluta segurança que este modelo de interação possa ser associado ao aumento do risco de câncer de mama.
- Há necessidade de análises adicionais, em amostras populacionais maiores e com um sistema de coleta de dados aprimorado, que permitam a realização de análises estatísticas mais refinadas, para a investigação da associação destes polimorfismos em genes no sistema de reparo de DNA e detoxificação e também dos fatores epidemiológicos e clínicos e sua possível utilização como marcadores de susceptibilidade ao câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; SOLIMAN, A. S.; BONDY, M. L.; OMAR S.; EL-BADAWY, S. A.; KHALED, H. M.; SEIFELDIN, I. A.; LEVIN, B. Inheritance of the *194Trp* and the *399Gln* variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. **Cancer Letters**, v.159, p.79-86, 2000.

AMBROSONE, C. B.; FREUDENHEIM, J. L.; THOMPSON, P. A.; BOWMAN, E.; VENA, J. E.; MARSHALL, J. R.; GRAHAM, S.; LAUGHLIN, R.; NEMOTO, T.; SHIELDS, P. G. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Research**, v.59, p.602-606, 1999.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast cancer facts & figures 2007-2008**. Atlanta: American Cancer Society Inc, 2007. 32p.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Cancer facts & figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society Inc, 2008a. 68p.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Cancer prevention & early detection facts & figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society Inc, 2008b. 56p.

BERNSTEIN, L.; HENDERSIN, B. E.; HANISCH, R.; SULIVAN-HALLEY, J.; ROSS, R. K. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. **Journal of the National Cancer Institute**, v.86, p.1403-1408, 1994.

BETTS, K. S. Second suspicions – breast cancer and passive smoking. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.3, p.137-143, 2007.

BLANK, E.W.; WONG, P.Y.; LAKSHMANASWAMY, R.; GUZMAN, R.; BOTH, S.N. Ovarian hormones estrogen and progesterone are necessary for hormonal mammary carcinogenesis in ovariectomized ACI rats. **PNAS**, v.105, n.9, p.3527-3532, 2008.

BOHR, V. A. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. **Carcinogenesis**, v.16, p.2885-2892, 1995.

BREM, R; HALL, J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.2512-2520, 2005.

BREWSTER, A.M.; JORGENSEN, T.J.; RUCZINSKI, I.; HUANG, H.Y.; HOFFMAN, S.; THUITA, L.; NEWSCHAFER, C.; LUNN, R.M.; BELL, D.; HELZLSouer, K.J. Polymorphisms of the DNA repair genes XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg399Gln and Arg194Trp): relationship to breast cancer risk and familial

predisposition to breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.95, p.73-80, 2006.

BULLEN, B. A.; SKRINAR, G. S.; BEITINS, I. Z. von MERING, G.; TURNBULL, B. A.; McARTHUR, J. W. Induction of menstrual disorders by strenuous exercise in untrained women. **New England Journal of Medicine**, v.312, p.1349-1353, 1985.

CAI, Q.; SHU, X. O.; WEN, W.; CHENG, J. R.; DAI, Q.; GAO, Y. T.; ZHENG, W. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai breast cancer study. **Breast Cancer Research**, v.6, p.647-655, 2004.

CHACKO, P.; RAJAN, B.; JOSEPH, T.; MATHEW, P. S.; PILLAI, M. R. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.89, p.15-21, 2005.

CHAN, E.C.; LAMB, S.Y.; FUC, K.H.; KWONGA, Y.L. Polymorphisms of the GSTM1, GSTP1, MPO, XRCC1, and NQO1 genes in Chinese patients with non-small cell lung cancers: relationship with aberrant promoter methylation of the CDKN2A and RARB genes. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.162, p.10-20, 2005.

CHOI, J.Y.; NEUHOUSER, M.L.; BARNETT, M.; HUDSON, M.; KRISTAL, A.R.; THORNQUIST, M.; KING, I.B.; GOODMAN, G.E.; AMBROSONE, C.B. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.16, n.6, p.1115-1120, 2007.

DELIGEZER, U; DALAY, N. Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. **Experimental and Molecular Medicine**, v.36, n.6, p.572-575, 2004.

DOHERTY, J. A.; WEISS, N. S.; FREEMAN, R. J.; DIGHTMAN, D. A.; THORNTON, P. J.; HOUCK, J. R.; VOIGT, L. F.; ROSSING, M. A.; SCHWARTZ, S. M.; CHEN, C. Genetic factors in catechol estrogen metabolism in relation to the risk of endometrial cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, n.2, p.357-366, 2005.

DUELL, E. J.; MILLKAN, R. C.; PITTMAN, G. S.; WINKEL, S.; LUNN, R. M.; TSE, C. K. J.; EATON, A.; MOHRENWEISER, H. W.; NEWMAN, B.; BELL, D. A. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10, p.217-222, 2001.

EGAN, K. M.; THOMPSON, P. A.; TITUS-ERNSTOFF, L.; MOORE, J. H.; AMBROSONE, C. B. MnSOD Polymorphism and breast cancer in a population-based case-control study. **Cancer Letters**, v.199, p.27-33, 2003.

FEICHT, C. B.; JOHNSON, T. S.; MARTIN, B. J.; SPAKES, K. E.; WAGNER, W.W. Jr. Secondary amenorrhea in athletes. **The Lancet**, v.2, p.1145-1146, 1978.

FEIGELSON, H. S. ; HENDERSON, B. E. Future possibilities in the prevention of breast cancer role of genetic variation in breast cancer prevention. **Breast Cancer Research**, v.2, p.277-282, 2000.

FERREIRA, D.G; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

FIGUEIREDO, J. C.; KNIGHT, J. A.; BRIOLLAIS, L.; ANDRULIS, I. L.; OZCELIK, H. Polymorphisms XRCC1-*R399Q* and XRCC3-*T241M* and the risk of breast cancer at Ontario site of the breast cancer family registry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.13, p.583-591, 2004.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; VICENT, L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancer. **New England Journal of Medicine**, v.312, p.17-19, 1980.

GAUDET, M.M; CHANOCK, S.; LISSOWSKA, J.; BERNDT, S.I.; PEPLONSKA, B.; BRINTON, L.A.; WELCH, R.; YEAGER, M.; BARDIN-MIKOLAJCZAK, A.; GARCIA-CLOSAS, M. Comprehensive Assessment of Genetic Variation of Catechol-OMethyltransferase and Breast Cancer Risk. **Cancer Research**, v.66, n.19, p.9781-9785, 2006.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.1, p.1513-1530, 2002.

GOTTLIEB, M.G.V.; SCHWANKE, C.H.A.; SANTOS, A.F.R.; JOBIM, P.F.; MÜSSEL, D.P.; DA CRUZ, I.B.M. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p.691-703, 2005.

HAIR JR. J. F; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HAN, J.; HANKINSON, S. E.; DE VIVO, I.; SPIEGELMAN, D.; TAMIMI, R. M.; MOHRENWEISER, H. W.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J. A prospective study of XRCC1 haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. **Cancer Research**, v.63 p.8536-8541, 2003.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, p.427-433, 2000.

HOLT, S.K.; ROSSING, M.A.; MALONE, K.E.; SCHWARTZ, S.M.; WEISS, N.S.; CHEN, C. Ovarian cancer risk and polymorphisms involved in estrogen catabolism. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.16, n.3, p.481-489, 2007.

HONG, C. C.; THOMPSON H. J.; JIANG, C.; HAMMOND, G. L.; TRITCHLER, D.; YAFFE, M.; BOYD, N. F. Val158Met polymorphism in *catechol-O-methyltransferase* gene associated with risk factors for breast cancer, **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.12, p.838-847, 2003.

HOSMER DW, LEMESHOW S. **Applied logistic regression**. 2.ed. New York: Wiley Series in Probability and Statistics, 1989.

HU, Z.; SONG, C.G.; LU, J.S. ; LUO, J.M.; SHEN, Z.Z.; HUANG, W.; SHAO, Z.M. A multigenic study on breast cancer risk associated with genetic polymorphisms of ER Alpha, COMT and CYP19 gene in BRCA1/BRCA2 negative Shanghai women with early onset breast cancer or affected relatives. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.133, p.969-978, 2007.

HUANG, C. S.; CHERN, H. D.; CHANG, K. J.; CHENG, C. W.; HSU, S. M.; CHEN, C. Y. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1 and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. **Cancer Research**, v.59, p.4870-4875, 1999.

HUBER, J. C.; SCHNEEBERGER, C.; TEMPFER, C. B. Genetic modeling of estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. **Maturitas**, v.41, p.55-64, 2002.

HUNG, R. J.; HALL, J.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Genetic Polymorphisms in the excision repair pathway and cancer risk: a huge review. **American Journal of Epidemiology**, v.162, n.10, p.925-942, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **A situação do câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/>. Acesso: setembro de 2008a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Câncer de mama**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=336. Acesso em: setembro de 2008b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Controle do câncer de mama – documento de consenso**. Brasil, 2004a, 33p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estimativa 2008 – incidência de câncer no Brasil**. Brasil, 2007, 94p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **O que é o câncer?** Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322. Acesso em: setembro 2008c.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Programa nacional de controle do câncer do colo do útero e de mama**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140. Acesso em: setembro 2008d.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **TMN – classificação de tumores malignos**. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª ed. Brasil, 2004b, 254p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. **World cancer report**. STWART, B.W.; KLEIHUES (Eds). IARC*Press*. Lyon, 2003.

JUSTENHOVEN, C.; HAMANN, U.; SCHUBERT, F.; ZAPATKA, M.; PIERL, C.B.; RABSTEIN, S.; SELINSKI, S.; MUELLER, T.; ICKSTADT, K.; GILBERT, M.; KO, Y.D.; BAISCH, C.; PESCH, B.; HARTH, V.; BOLT E.M.; VOLLMERT, C.; ILLIG, T.; EILS, R.; DIPPON, J.; BRAUCH, H. Breast cancer: a candidate gene approach across the estrogen metabolic pathway. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.108, p.137-149, 2008.

KELLEN, E.; VANSANT, G.; CHRISTIAENS, M.R.; NEVEN, P.; LIMBERGEN, E.V. Lifestyle changes and breast cancer prognosis: a review. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2008.

KEY, T. J. Serum oestradiol and breast cancer risk. **Endocrine-related cancer**, v.6, p.75-180, 1999.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA Double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v.27, p.247-253, 2001.

KNIGHT, J.A.; ONAY, U.V.; WELLS, S.; LI, H.; SHI, E.J.Q.; ANDRULIS, I.L.; OZCELIK, H. Genetic variants of GPX1 and SOD2 and breast cancer risk at the Ontario Site of the Breast Cancer Family Registry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.13, p.146-149, 2004.

KROPP, S.; CHANG-CLAUDE, J. Active and passive smoking and risk of breast cancer by age 50 years among german women. **American Journal of Epidemiology**, v.157, n.7, p.616-626, 2002.

KUSCHEL, B.; AURANEN, A.; McBRIDE, S.; NOVIK, K. L.; ANTONIOU, A.; LIPSCOMBE, J. M.; DAY, N. E.; EASTON, D. F.; PONDER, B. A. J.; PHAROAH, P. D. P.; DUNNING, A. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v.11, p.1399-1407, 2002.

L'HERMITEA, M.; SIMONCINIB, T. FULLER, S.; GENAZZANI, A.R.; Could transdermal estradiol + progesterone be a safer postmenopausal HRT? A review. **Maturitas**, v.60, p.185-201, 2008.

LI, Y.; YANG, X.; CHANG, M.; YAGER, J. D.; VAN BREEMEN, R. B.; BOLTON, J. L. Functional and structural comparisons of cysteine residues in the Val108 wild type and met 108 variant of human soluble catechol-*O*-methyltransferase. **Chemico-Biological Interactions**, v.152, p.151-163, 2005.

LIEHR, J. G. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? **Endocrine Reviews**. **Endocrine Society of U.S.A**, v.21, p.40-54, 2000.

LIEHR, J.G. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. **Human Reproduction Update**, v.7, n.3, p.273-281, 2001.

LIN, W.Y.; CHOU, Y.C.; WU, M.H. JENG, Y.L.; HUANG, H.B.; YOU, S.L.; CHU, T.Y.; CHEN, C.J.; SUN, C.A. Polymorphic catechol-*O*-methyltransferase gene, duration of estrogen exposure, and breast cancer risk: A nested case-control study in Taiwan. **Cancer Detection and Prevention**, v.29, p.427-432, 2005.

LOIZIDOU, M.A.; MICHAEL, T.; NEUHAUSEN, S.L.; NEWBOLD, R.F.; MARCOU, T.; KAKOURI, E.; DANIEL, M.; PAPADOPOULOS, P.; MALAS, S.; KYRIACOU, K.; HADJISAVVAS, A. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC2 and XRCC3 and risk of breast cancer in Cyprus. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.112, n.3, p.575-579, 2007.

MARCHAND, L.L.; DONLON, T.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E.; WILKENS, L.R. Estrogen metabolism-related genes and breast cancer risk: the multiethnic cohort study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.14, n.8, p.1998-2003, 2005.

MARTIN, R.C.G.; AHN, J.; NOWELL, S.A.; HEIN, D.W.; DOLL, M.A.; MARTINI, B.D.; AMBROSONE, C.B. Association between manganese superoxide dismutase promoter gene polymorphism and breast cancer survival. **Breast Cancer Research**, v.8, p.45-54, 2006.

MARTIN, R.C.G.; BARKER, D.F. DOLL, M.A.; PINE, S.R.; MECHANIC, L.; BOWMAN, E. D.; HARRIS, C.C.; HEIN, D.W. Manganese superoxide dismutase gene coding region polymorphisms lack clinical incidence in general population. **DNA and Cell Biology**, v.27, n.6, p.321-323, 2008.

MATSUI, A.; IKEDA, T.; ENOMOTO, K.; NAKASHIMA, H.; OMAE, K.; WATANABE, M.; HIBI, T.; KITAJIMA, M. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to genotypes of catechol-O-methyltransferase. **Cancer Letters**, v.150, p.23-31, 1999.

McPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. Breast cancer – epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ Journals**, v.321, p.624-628, 2000.

METSOLA, K.; KATAJA, V.; SILLANPÄÄ, P.; SIIVOLA, P.; HEIKINHEIMO, L.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V.M.; UUSITUPA, M.; HIRVONEN, A. XRCC1 and XPD genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish case-control study. **Breast Cancer Research**, v.7, p.987-997, 2005.

MILLKAN, R. C.; PLAYER, J.; DE COTRET, A. R.; MOORMAN, P.; PITTMAN, G.; VANNAPPAGARI, V; TSE, C. K.; KEKU, T. Manganese superoxide dismutase Ala-9Ala polymorphisms and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and Whites. **Breast Cancer Research**, v.6, p.264-274, 2004.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v.544, p.9-41, 2003.

MITRUNEN, K.; JOURENKOVA, N.; KATAJA, V.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V. M.; BENHAMOU, S.; KANG, D.; VAINIO, H.; UUSITUPA, M.; HIRVONEN, A. Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10, p.635-640, 2001.

MIYOSHI, Y.; NOGUCHI, S. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.471-481, 2003.

MODUGNO, F.; ZMUDA, J. M.; POTTER, D.; CAI, C. ZIV, E.; CUMMINGS, S. R.; STONE, K. L.; MORIN, P. A.; GREENE, D.; CAULEY J. A. Estrogen metabolizing polymorphisms and breast cancer risk among older White women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.93, p.261-270, 2005.

MORABIA, A.; BERNSTEIN, M.; HÉRITIER, S.; NHATCHATRIAN, N. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. **American Journal of Epidemiology**, v.143, n.9, p.918-928, 1996.

MORCH, L. S.; JOHANSEN, D.; THYGESEN, L. C.; TJONNELAND, A.; LOKKEGAARD, E.; STAHLBERG, C. GRONBAEK, M. Alcohol drinking, consumption patterns and breast cancer among Danish nurses: a cohort study. **The European Journal of Public Health**, p.1-6, 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI. **Genetics of Breast and Ovarian Cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/healthprofessional/allpages>. Acesso em: setembro 2008.

ONAY, V.U.; AALTONEN, K.; BRIOLLAIS, L.; KNIGHT, J.A.; PABALAN, N.; KILPIVAARA, O.; ANDRULIS, I.L.; BLOMQUIST, C.; NEVANLINNA, H.; OZCELIK, H. Combined effect of CCND1 and COMT polymorphisms and increased breast cancer risk **BMC Cancer**, v.8, p.6-16, 2008.

ONAY, V.U.; BRIOLLAIS, L.; KNIGHT, J.A.; SHI, E.; WANG, Y.; WELLS, S.; LI, H.; RAJENDRAM, I.; ANDRULIS, I.L.; OZCELIK, H. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. **BMC Cancer**, v.6, p.114-130, 2006.

PACHKOWSKI, B.F.; WINKEL, S.; KUBOTA, Y., SWENBERG, J.A.; MILLIKAN, R.C.; NAKAMURA, J. XRCC1 genotype and breast cancer: functional studies and epidemiologic data show interactions between XRCC1 codon 280 His and smoking. **Cancer Research**, v.66, n.5, p. 2860-2868, 2006.

REYNOLDS, P.; HURLEY, S.; GOLDBERG, D. E.; ANTON-CULVER, H.; BERNSTEIN, L.; DEAPEN, D.; HORN-ROSS, P. L.; PEEL, D.; PINDER, R.; ROSS, R. K.; WEST, D.; WRIGHT, W. E.; ZIOGAS, A. Active smoking, household passive smoking and breast cancer: evidence from the California teachers study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, n.1, p.29-37, 2004.

RUMEL, D. "Odds ratio": algumas considerações. **Revista da Saúde Pública de São Paulo**, v.20, n.3, p.253-258, 1986.

SAADAT, M.; ANSARI-LARI, M. Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor, v.1, 2001.

SANGRAJRANG, S.; SCHMEZER, P.; BURKHOLDER, I.; WAAS, P.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P.; BARTSCH, H.; WIANGNON, S.; POPANDA, O. Polymorphisms in three base excision repair genes and breast cancer risk in Thai women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.111, p.279-288, 2008.

SAZCI, A.; ERGUL, E.; UTKAN, N. Z.; CANTURK, N. Z.; KAYA, G. Catechol-*O*-methyltransferase Val108/158Met polymorphism in premenopausal breast cancer patients. **Toxicology**, v.204, p.197-202, 2004.

SEEDHOUSE, C.; FAULKNER, R.; ASHRAF, N.; DAS-GUPTA, E.; RUSSEL, N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.2675-2680, 2004.

SELLERS, T.A.; SCHILDKRAUT, J.M.; PANKRATZ, V.S.; VIERKANT, R.A.; FREDERICKSEN, Z.S.; OLSON, J.E.; CUNNINGHAM, J.; TAYLOR, W.; LIEBOW, M.; MCPHERSON, C.; HARTMANN, L.C.; PAL, T.; ADJEI, A.A. Estrogen bioactivation, genetic polymorphisms, and ovarian cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.14, n.11, p.2536-2543, 2005.

SHEN, J.; GAMMON, M. D.; TERRY, M. B.; WANG, L.; WANG, Q.; ZHANG, F.; TEITELBAUM, S. L.; ENG, S. M.; SAGIV, S. K.; GAUDET, M. M.; NEUGUT, A. I.; SANTELLA, R. M. Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, p.336- 342, 2005.

SILVA, S.N.; CABRAL, M.N.; DE CASTRO, G.B.; PIRES, M.; AZEVEDO, A.P.; MANITA, I.; ESPERAN, J.; PINA, J.E.; RUEFF, J.; GASPAR, J. Breast cancer risk and polymorphisms in genes involved in metabolism of estrogens (CYP17, HSD17 β 1, COMT and MnSOD): Possible protective role of MnSOD gene polymorphism Val/Ala and Ala/Ala in women that never breast fed. **Oncology Reports**, v.16, p.781-788, 2006.

SILVA, S.N.; MOITA, R.; AZEVEDO, N.P.; GOUVEIA, R.; MANITA, I.; PINA, J.E.; RUEFF, J.; GASPAR, J. Menopausal age and XRCC1 gene polymorphisms: Role in breast cancer risk. **Cancer Detection and Prevention**, v.31, p.303-309, 2007.

SMITH, T.R.; LEVINE, E.A.; FREIMANIS, R.I.; AKMAN, S.A.; ALLEN, G.O.; HOANG, K.N.; LIU-MARES, W.; HU, J.J. Polygenic model of DNA-repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.29, p.1-24, 2008.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**. 3 ed. Tradução de Henrique Bunselmeyer *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2002. 576 p.

STRATTON, M.R.; RAHMAN, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. **Nature Genetics**, v.40, p.17-22, 2008.

TAMIMI, R. M.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J. Manganese superoxido dismutase polymorphisms, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.13, p.989-996, 2004.

TANAKA, Y.; SASAKI, M.; SHIINA, H.; TOKIZANE, T.; DEGUCHI, M.; HIRATA, H.; HINODA, Y.; OKAYAMA, N.; SUEHIRO, Y.; URAKAMI, S.; KAWAKAMI, T.; KANEUCHI, M.; POOKOT, D.; IGAWA, M.; OKUYAMA, A.; ISHII, N.; DAHIYA, R. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and sporadic prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.15, n.2, p.238-244, 2006.

THUNE, J.; BRENN, T.; LUNDE, E.; GAARD, M. Physical activity and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**. v.336, p.1269-1275, 1997.

THYAGARAJAN, B.; ANDERSON, K.E.; FOLSOM, A.R.; JACOBS JR, D.R.; LYNCH, C.F.; BARGAJE, A.; KHALIQ, W.; GROSS, M.D. No association between XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms and breast cancer risk: Iowa Women's Health Study. **Cancer Detection and Prevention**, v.30, p.313-321, 2006.

WANG, C; SUN, Y.; HAN R. XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis. **Urology**, v.72, p.1-4, 2008.

WEBB, P. M.; HOPPER, J. L.; NEWMAN, B.; CHEN, X.; KELEMEN, L.; GILES, G. G.; SOUTHEY, M. C.; CHENEVIX-TRENCH, G.; SPURDLE, A. B. Double-strand break reappear gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, n.2, p.319-323, 2005.

WEN, W.; CAI, Q.; SHU, X.O.; CHENG, J.R.; PARL, F.; PIERCE, L.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase genetic polymorphisms and breast cancer risk in Chinese women: results from the Shanghai Breast Cancer Study and a meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, n.2, p.329-335, 2005.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood and disease. **Annals of Human Genetics**. v.19, p.251-253, 1955.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: setembro 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER – WHO/UICC. **Global action against cancer**. Geneva, 2005. 24p.

ZHANG, Y.; NEWCOMB, P.A.; EGAN, K.M.; TITUS-ERNSTOFF, L.; CHANOCK, S.; WELCH, R.; BRINTON, L.A.; LISSOWSKA, J.; BARDIN-MIKOLAJCZAK, A.; PEPLONSKA, B.; SZESZENIA-DA BROWSKA, N; ZATONSKI, W. GARCIA-CLOSAS; M. Genetic Polymorphisms in Base-Excision Repair Pathway Genes and Risk of Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.15, n.2, p.353-358, 2006.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Controle
Declaração de Consentimento - Grupo Controle
Questionário - Grupo Controle

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para sabermos seu histórico clínico e hábitos pessoais.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis,

Assinatura: _____ RG: _____

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

QUESTIONÁRIO – Grupo Controle

Data: __/__/__ **Coleta:** () sangue **Entrevistador:** _____

Dados Pessoais:

Nome: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____
 Profissão: _____ Escolaridade: _____
 Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____
 Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____
 Naturalidade: _____ Ascendência: _____
 Etnia e cor: () Euro-descendente () Afro-descendente
 () Asiático-descendente () Indígena-descendente
 Observações: _____

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____
 Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____
 Nome da mãe: _____
 Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____
 Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

 Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

 Come CARNE regularmente? () Sim () Não
 Tipo: _____
 Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não
 Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente
 Quantidade: _____
 Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
 () Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?
 () Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª

Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____ () E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Casos de **Doença Auto-imune** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo: _____

Observações:

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pacientes
Declaração de Consentimento - Pacientes
Questionário - Pacientes

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E
GENÉTICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA, será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo e também relacionados ao reparo de DNA) e o aparecimento desta doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contacto. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, não influenciando no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Maria Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc.

Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e de tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador principal _____

Pesquisador responsável _____

Florianópolis, ____/____/____

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecida sobre a pesquisa “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis,

Assinatura: _____ RG: _____

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

QUESTIONÁRIO - Pacientes

Data: __/__/__

Entrevistador: _____

Coleta: () sangue () tumor

Médico responsável: _____

Dados Pessoais:

Nome do Paciente: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Profissão: _____ Escolaridade: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____

Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____

Etnia e cor: () Euro-descendente () Afro-descendente

() Asiático-descendente () Indígena-descendente

Observações:

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Come CARNE regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não
 Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente
 Quantidade: _____
 Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
 () Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?
 () Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não

Tipo: _____
 Frequência: _____

FUMA? () Sim () Não FUMOU? () Sim () Não

Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____

Quantidade e Frequência: _____

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não Idade: _____

PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª

Gestação _____

Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____ () E _____

Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER** na família? () Sim () Não

Grau de Parentesco: _____

Tipo: _____

Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não

Local: _____

Grau de Parentesco: _____

Tem ou teve alguma outra doença grave? _____

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não

Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Histórico do CAMA:

Observações:

